

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

ALCIDES PROCÓPIO JUSTINIANO DOS SANTOS JUNIOR

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO
PARA A MALÁRIA APLICADO EM UNIDADE DE SAÚDE NO MUNICÍPIO DE
PORTO VELHO, RONDÔNIA

PORTO VELHO - RO

2015

ALCIDES PROCÓPIO JUSTINIANO DOS SANTOS JUNIOR

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO
PARA A MALÁRIA APLICADO EM UNIDADE DE SAÚDE NO MUNICÍPIO DE
PORTO VELHO, RONDÔNIA

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de Pós-Graduação em
Biologia Experimental, do Núcleo de
Saúde, da Universidade Federal de
Rondônia – UNIR, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Experimental.

Orientador: Dr. Tony Hiroshi Katsuragawa

PORTO VELHO - RO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Santos Junior, Alcides Procópio Justiniano dos.

S237a

Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária aplicado em unidade de saúde no município de Porto Velho, Rondônia. / Alcides Procópio Justiniano dos Santos Junior, Porto Velho, 2015.

83f.

Orientador: Prof. Dr. Tony Hiroshi Katsuragawa

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. Malária. Diagnóstico. 2. Teste rápido. 3. Gota espessa. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.936

Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905

Candidato: ALCIDES PROCÓPIO JUSTINIANO DOS SANTOS JUNIOR

Título da Dissertação: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA A MALÁRIA APLICADO EM UNIDADE DE SAÚDE NO MUNICÍPIO DE PORTO VELHO, RONDÔNIA.

Defesa da Dissertação do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, nível Mestrado, em Sessão Pública realizada em 18 de Abril de 2015.

Banca Examinadora

1) **Dr. Tony Hiroshi Katsuragawa** - Presidente (CEPEM)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) **Dr. Mauro Shugiro Tada** – 1º Titular (PGBIOEXP)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) **Dra. Joana D’Arc Neves Costa** – 2º Titular (CEPEM)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) **Dr. Weber Cheli Batista**– 1º Suplente (CEPEM)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) **Dra. Genimar Rebouças Julião** – 2º Suplente (FIOCRUZ-RO)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado integralmente através do **Laboratório de Epidemiologia do Cepem-Fiocruz Rondônia** com apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq (Processo 555652/2009-2) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), PRONEX-Rede Malária, Mato Grosso.

RESUMO

Introdução: O método da gota espessa para o diagnóstico da malária é considerado o padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde, entretanto, existem localidades que não possuem esses serviços de diagnóstico. Devido a isto, testes rápidos baseados em imunocromatografia estão sendo amplamente utilizados por não necessitar de equipamentos e nem de qualificação especial de recursos humanos. Recentemente alguns municípios brasileiros de área endêmica para esta doença estão utilizando o teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT, baseado na detecção do antígeno pfrp2 do *P. falciparum* e pLDH pan específico para as espécies de *Plasmodium* causadoras da malária humana. **Objetivo:** O presente estudo buscou avaliar o desempenho do teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT por meio de análise de concordância com a gota espessa e PCR. **Métodos:** O estudo foi realizado no município de Porto Velho, no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) no período de Outubro de 2012 a Agosto de 2014. Foi realizada coleta de sangue periférico para realizar o exame por teste rápido e PCR de pacientes com resultado positivo ou negativo para gota espessa. **Resultados:** Foram realizados 648 exames de testes rápidos em pacientes de ambos os sexos (M=435; F=213) com idade variando de 18 a 60 anos. Dentre os exames de testes rápidos realizados, 56 apresentaram resultados inválidos. Quando comparado à gota espessa, o teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT apresentou valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para *P. falciparum* de 63,16%; 99,30%; 75,00%; 98,78% respectivamente, e para *P. vivax* de 82,19%; 96,78%; 93,75%; 90,25% respectivamente. Em relação à PCR os valores foram 63,16%; 99,30%; 75,00%; 98,78% respectivamente para *P. falciparum*, e 78,45%; 97,49%; 95,29%; 87,50% para *P. vivax*. **Conclusão:** O teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT apresentou sensibilidade inferior a relatada pelo fabricante e abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde, apresentando discordância mais acentuada nas parasitemias abaixo de 100 parasitos/ μ L. A especificidade observada foi satisfatória.

Palavras chave: Malária; Diagnóstico; Teste rápido; Gota espessa.

ABSTRACT

Introduction: The method of thick blood film for malaria diagnosis is considered the gold standard by the World Health Organization, however, there are locations that do not have such diagnostic services. Because of this, rapid tests based on immunochromatography are being widely used for not to need of equipments and special qualification of human resources. Recently some Brazilian municipalities of endemic areas for this disease are using the rapid test SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT, based on antigen detection pfrp2 of *P. falciparum* and pLDH pan specific for *Plasmodium* species that cause human malaria. **Objective:** The present study aimed to evaluate the performance of rapid test SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT through of analysis of concordance with the thick blood film and PCR. **Methods:** The study was realized in the Porto Velho City, in the Center of Research in Tropical Medicine (CEPEM) in the period from October 2012 to August 2014. Peripheral blood samples were collected to realize the exam thick blood film and PCR of patients with positive or negative results for thick blood film. **Results:** Were performed 648 exams of rapid tests in patients of both sexes (M = 435, F = 213), with age ranging of 18-60 years. Among the exams of rapid tests performed, 56 showed invalid results. When compared to thick blood film, the rapid test SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT showed values of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for *P. falciparum* of 63.16%; 99.30%; 75.00%; 98.78%, respectively, and *P. vivax* 82.19%; 96.78%; 93.75%; 90.25% respectively. In relation to PCR, the values were 63.16%; 99.30%; 75.00%; 98.78% respectively for *P. falciparum*, and 78.45%; 97.49%; 95.29%; 87.50% for *P. vivax*. **Conclusion:** The rapid test SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT showed sensitivity lower to reported by the manufacturer and below the recommended by the World Health Organization, showing disagreement more accentuated on parasitaemias below of 100 parasites/ μ L. The observed specificity was satisfactory.

Key words: Malaria; Diagnosis; Rapid test; Thick blood film.

Dedico

À minha esposa Maria Teixeira, à minha filha Isabele, à minha mãe Carmelita, aos meus avôs Olavo e Tereza (*in memorian*) e a todos meus familiares que sempre me apoiaram.

Epígrafe

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que pareciam impossíveis.”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por ter me dado força para seguir caminhando em busca de mais um objetivo.

Agradeço à minha amada esposa **Maria Teixeira do Nascimento Filha** pelo amor e companheirismo nunca negado.

Agradeço ao meu orientador **Tony Hiroshi Katsuragawa** pelo ensinamento, apoio e confiança.

Agradeço ao **Dr. Mauro Shugiro Tada** pela oportunidade.

Agradeço ao **Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes** pela parceria e por ter tornado esse trabalho possível.

Agradeço aos professores da Pós-graduação pelo incentivo e contribuição.

Agradeço a todos do Laboratório de Epidemiologia da malária do CEPEM/FIOCRUZ-RO (**Josiane, Tatiana, Alzemar, Jeane e Júlio**) pelo apoio incondicional nessa caminhada.

Agradeço a todos do Laboratório de Epidemiologia Molecular da malária do CEPEM/FIOCRUZ-RO, em especial a **Dra. Joana D'Arc Neves Costa** pela confiança e ensinamentos, ao meu amigo **Roger Lafontaine** que sempre esteve ao meu lado me apoiando, e a todos os estagiários.

Agradeço aos microscopistas do CEPEM que tão importantes foram para a realização desse trabalho, assim como a todos da Plataforma Técnica pelo apoio.

Agradeço aos pacientes que participaram do estudo pela gentileza da colaboração e que tão importantes foram para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente foram importantes para a conquista desse objetivo.

Agradeço às agências financeiras pelo apoio: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), PRONEX – Rede Malária.

Agradeço as instituições pelo apoio em todas as etapas desse trabalho:

- A UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA (UNIR) pelo programa e oportunidade;
- A FIOCRUZ-RO e ao CEPEN pelo apoio logístico;
- A UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO pela parceria.

Lista de Figuras

Figura	Descrição	Páginas
1	Distribuição dos casos de malária na Amazônia Legal (1980-2013).	19
2	Kit comercial do RDT-SB (Standard Diagnostics, Inc).	28
3	Coleta de sangue por punção digital e confecção da gota espessa.	33
4	Imagem de um distendido sanguíneo.	34
5	Esquema das etapas para realização do exame pelo RDT-SB.	37
6	Distribuição dos participantes do estudo de acordo com o sexo.	44
7	Imagem de RDT-SB representativo de resultado inválido.	45
8	Exames para malária realizados com os RDTs-SB.	52
9	Imagem da curva de absorbância de amostras quantificadas em espectrofotômetro.	53
10	Avaliação da qualidade e quantidade do gDNA plasmodial extraído pelo método Fenol-Clorofórmio.	54
11	Amostras de participantes que apresentaram positividade na PCR para as espécies <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .	55
12	Imagem de gel com amostra positiva para <i>P. vivax</i> submetidas a diluições seriadas para análise da sensibilidade da PCR.	55

Lista de Tabelas

Tabela	Descrição	Páginas
1	Parasitemia da malária utilizada pelo Ministério da Saúde.	35
2	Escala de concordância do KAPPA.	42
3	Frequência de resultados inválidos, negativos e positivos para <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e infecções por <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> entre os métodos de diagnóstico: GE, RDT-SB e PCR.	46
4	Análise de concordância entre o RDT-SB e a microscopia (GE).	46
5	Análise de concordância entre o RDT-SB e a PCR.	47
6	Análise de concordância entre a microscopia e a PCR.	48
7	Estimativa de parâmetros e desempenho do RDT-SB comparado com a microscopia.	49
8	Estimativa de parâmetros e desempenho do RDT-SB comparado com a PCR.	51
9	Estimativa de parâmetros e desempenho da microscopia (GE) comparada à PCR.	56
10	Análise de Concordância entre os resultados do RDT-SB e a microscopia (GE) de acordo com o nível de parasitemia.	57

Lista de Quadros

Quadro	Descrição	Páginas
1	Total de Casos de malária no ano de 2013 no Brasil, Rondônia e Porto velho.	21
2	Óligos utilizados nas reações PCR do estudo.	40
3	Condições de ciclagem da temperatura de desnaturação, anelamento e extensão para o gênero e espécies de <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i> .	40
4	Interpretação dos resultados entre os métodos analisados por meio de quadro de contingência	43

Lista de Siglas e Abreviaturas

CEM	Campanha de Erradicação da Malária
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
DEOPE	Departamento de Operações
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Etileno DiaminoTetracético
FNS	Fundação Nacional de Saúde
gDNA	DNA plasmodial
GE	Gota espessa
HRP-2	Proteína 2 rica em histidina
MS	Ministério da Saúde
Pb	Pares de base
PBS	Salina Tamponada fosfatada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal
pLDH	Lactato Desidrogenase Plasmodial
PNCM	Plano Nacional de Controle da Malária
RDTs	Rapid Diagnostic Tests
RDT-SB	RDT SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT
Rpm	Rotação por minuto
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SIVEP-Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Malária
ssrRNA	Subunidade ribossomal do RNA
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
WHO	World Health Organization

Sumário

Item	Descrição	Páginas
1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	HISTÓRICO E TRANSMISSÃO DA MALÁRIA	17
1.2	EPIDEMIOLOGIA	18
1.2.1	Epidemiologia da malária no mundo	18
1.2.2	Epidemiologia da malária no Brasil	18
1.2.3	Epidemiologia da malária em Rondônia	19
1.3	ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MALÁRIA	21
1.4	DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS	23
1.4.1	Método tradicional de diagnóstico da malária (Gota espessa)	24
1.4.2	Diagnóstico molecular da malária (PCR)	25
1.4.3	Diagnóstico por teste rápido baseado na imunocromatografia (RDTs)	26
2.	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	LOCAL DO ESTUDO	30
3.2	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	30
3.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	30
3.3.1	Coleta de sangue e armazenamento da amostra	31
3.4	CONFECÇÃO DA GOTA ESPESSA, DISTENDIDO SANGUÍNEO E ETAPAS DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS	31
3.4.1	Gota espessa	31
3.4.2	Coloração das lâminas pelo método de Walker	33
3.4.3	Preparo do distendido sanguíneo	34
3.4.4	Coloração da lâmina do distendido sanguíneo	34
3.5	PROCEDIMENTO DE REALIZAÇÃO DO EXAME PELO RDT-SB	35
3.6	PREPARO E EXTRAÇÃO DE DNA EM PAPEL DE FILTRO PELO MÉTODO FENOL- CLOROFÓRMIO	37
3.7	OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DOS CONTROLES	38
3.8	QUANTIFICAÇÃO DO gDNA	39
3.9	TÉCNICA PCR PARA MALÁRIA	39
3.10	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DA PCR	41
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	41
4.	RESULTADOS	44
4.1	PARTICIPANTES DO ESTUDO	44
4.2	FREQUÊNCIA DOS RESULTADOS ENTRE OS MÉTODOS ANALISADOS: GOTA ESPESSA, RDT-SB E PCR.	44

4.3	AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE O RDT-SB E A MICROSCOPIA.	46
4.4	AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE O RDT-SB E A PCR	47
4.5	AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE MICROSCOPIA E A PCR	48
4.6	ANÁLISE DE PARÂMETROS E DESEMPENHO DO RDT-SB COMPARADO À MICROSCOPIA	49
4.7	ANÁLISE DE PARÂMETROS E DESEMPENHO DO RDT-SB COMPARADO À PCR	50
4.8	AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DO gDNA PLASMODIAL POR ESPECTOFOTOMETRIA	52
4.9	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIDADE DO gDNA PLASMODIAL EM GEL DE AGAROSE A 0,8%	53
4.10	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR	54
4.11	SENSIBILIDADE DA PCR	54
4.12	ANÁLISE DE PARÂMETROS E DESEMPENHO DA MICROSCOPIA (GE) COMPARADA À PCR	56
4.13	ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE O RDT-SB E A MICROSCOPIA (GE) DE ACORDO COM O NÍVEL DE PARASITEMIA	57
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÃO	68
7.	RECOMENDAÇÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E TRANSMISSÃO DA MALÁRIA

A malária é uma doença antiga, sendo possível que exista antes mesmo da humanidade (REY, 2011). De acordo com Camargo (1995) há relatos históricos de que a malária humana parece acompanhar o homem desde seus primórdios, com registros de quadros febris em escritas chinesas (3000 a.C), tábuas cuneiformes na Mesopotâmia (2000 a.C) e na Índia (1800 a.C).

No século XIX, Charles-Louis-Alphonse Laveran, em 1880, foi o primeiro a identificar o parasito da malária no microscópio, e somente em 1898, Ronald Ross descobriu sua etiologia e provou que era um mosquito o vetor transmissor da doença, e observou também o desenvolvimento de oocisto na parede do estômago do *Anopheles*. Porém a descrição completa do ciclo dos parasitas da malária humana, só ocorreu entre 1898-1899, por Giovanni Batista Grassi (PESSOA, 1978; DESOWITZ, 1991; DE CASTRO, SINGER 2007).

A malária representa um dos graves problemas de saúde pública mundial. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, as espécies de plasmódios que habitualmente parasitam o homem são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, essa última com distribuição limitada ao Continente Africano (BRASIL, 2009; REY, 2011). Outra espécie de *Plasmodium* capaz de causar malária humana foi detectada no sudeste asiático, o *P. knowlesi* (SINGH et al., 2004).

O vetor responsável em transmitir a doença ao homem é o mosquito do gênero *Anopheles*. As principais espécies de *Anopheles* responsáveis pela transmissão da doença no Brasil são: *A. aquasalis*, *A. albitarsis* e *A. darlingi*, sendo esta última, o principal vetor da malária na Amazônia (CONSOLI e LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 1994).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.2.1 Epidemiologia da malária no mundo

A malária representa um dos graves problemas de saúde pública mundial. A doença ocorre principalmente em países de clima tropical e subtropical atingindo principalmente pessoas que vivem em regiões mais pobres da África, Ásia, Américas Central e do Sul, prejudicando o desenvolvimento socioeconômico da população (WHO, 2013).

A África Subsaariana apresenta o maior foco de transmissão da doença com 90% dos casos registrados no mundo. Atualmente existe cerca de 97 países com focos de transmissão da doença e 7 em fase de prevenção de reintrodução, totalizando 104 países considerados endêmicos para malária (WHO, 2013).

Estima-se que aproximadamente 3,4 bilhões de pessoas residem em áreas de risco de contrair a malária, dessas 1,2 milhões foram consideradas de alto risco, com registro de mais de um caso por 1000 habitantes, e que no ano de 2012 tenha ocorrido 207 milhões de casos e 627 mil mortes, sendo as crianças do continente africano com idade inferior a 5 anos as mais acometidas (WHO, 2014).

1.2.2 Epidemiologia da malária no Brasil

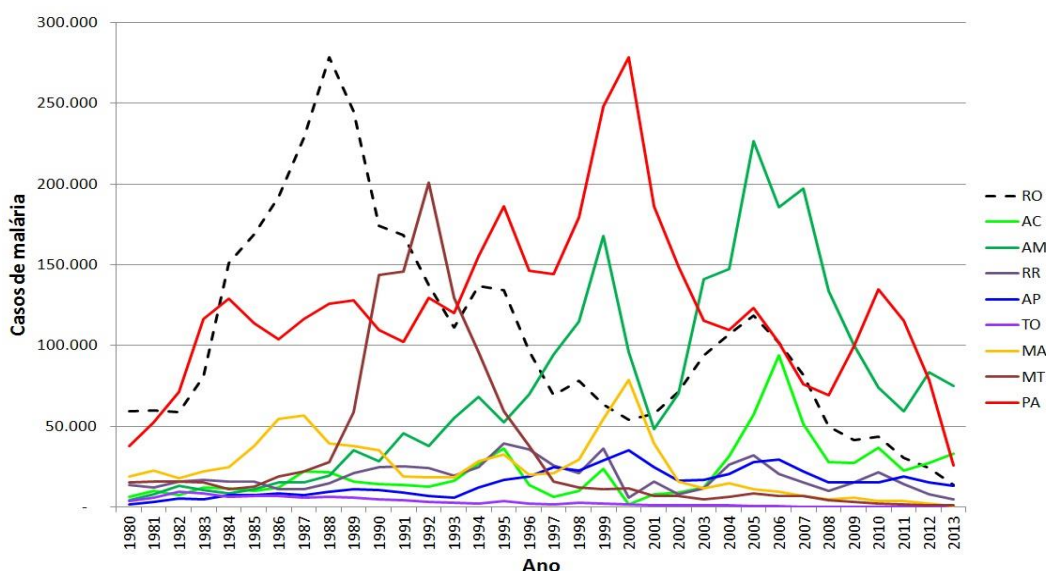
O risco de transmissão de malária no Brasil não é uniforme, aproximadamente 99% dos casos, cerca de 500.000 casos anuais, ocorre na área endêmica da Amazônia Legal, que corresponde a um conjunto de nove Estados brasileiros; Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão (BRASIL, 2008). Este quadro se deu do final da década de 1980 até o ano de 2006, quando o número de casos começou a declinar, atingindo o patamar de 200.000 casos em 2013 (BRASIL, 2013).

A figura 1 apresenta a distribuição do número de casos de malária entre os Estados que compõe a Amazônia Legal no período de 1980 a 2013.

Historicamente a endemia de malária na Amazônia está intimamente relacionada ao ambiente natural, onde fatores como temperatura, umidade,

condições climáticas e ecológicas, grande quantidade de rios, dentre outros, são fatores que favorecem o desenvolvimento de vetores e parasitas da doença (MARQUES, 1994).

Figura 1: Distribuição dos casos de malária na Amazônia legal (1980-2013).



Fonte: Gerência Técnica de Malária DEOPE/FNS; SIM/CENEPI/FNS; Rey, 2011; SVS/SIVEP-Malária.

Na década de 1980, Rondônia foi o Estado com o maior número de casos de malária, registrando quase 300.000 casos.

Nesse período, o número de casos de malária elevou-se principalmente em áreas que sofriam impactos por projetos de colonização, exploração de madeiras e áreas de garimpo (BARATA, 1995). Entretanto, nas últimas duas décadas, o número de casos diminuiu de aproximadamente 500.000 para pouco menos de 300.000 casos (BRASIL, 2012). Em 2013, foram registrados 177.679 casos positivos de malária no Brasil (BRASIL, 2013).

1.2.3 Epidemiologia da malária em Rondônia

A malária no Estado de Rondônia esteve sempre acompanhando os grandes processos de imigração que ocorreram em vários momentos do contexto histórico do Estado. Um dos mais importantes foi a busca da borracha na Amazônia devido ao

alto preço da mesma na Europa e Estados Unidos na segunda metade do século XIX, que culminou na construção da Estrada de Ferro Madeira Mamoré (E.F.M.M.) no início do século XX. Durante a II Grande Guerra também houve a busca pela borracha. Posteriormente, no final da década de 1960 e início dos anos de 1970 surgiu um novo fluxo migratório devido ao projeto de integração nacional, com abertura e construção de rodovias, criação de projetos de colonização e também a busca de ouro nos leitos dos rios do Estado, atraindo principalmente migrantes do Sul do país. Nessa época houve um aumento exacerbado da população em Rondônia, população essa, que em sua maioria morava em condições precárias, próximas aos rios e coleções d'água, culminando no aumento da incidência da malária no final da década de 1980 (KATSURAGAWA et al., 2008).

Mais recentemente uma importante onda migratória ocorreu no Estado devido à construção das usinas hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau. No ano de 2009, houve um aumento da incidência da malária em Jaci-Paraná, distrito de Porto Velho (FREITAS, 2010). O aumento do número de casos de malária pode estar relacionado com aumento da população atraída pela construção das usinas hidrelétricas, já que com a chegada do empreendimento, houve aumento na oferta de empregos, o que atraiu muitas pessoas para o Estado.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2013 no Estado de Rondônia foram notificados 14.497 casos de malária, sendo que destes, 13.766 corresponderam à infecção por *P. vivax*, 605 casos de *P. falciparum* e 49 *P. falciparum* + *P. vivax*, e em 77 casos não foi informada a espécie (BRASIL, 2013).

No município de Porto Velho no mesmo ano foram registrados 9.134 casos positivos de malária, sendo 8.719 casos de *P. vivax*, 391 de *P. falciparum* e 24 para *P. falciparum* + *P. vivax* (Quadro 1).

Quadro 1: Total de Casos de malária no ano de 2013 no Brasil, Rondônia e Porto velho.

ÁREA	TOTAL DE CASOS	V	F	F+V	M	O
BRASIL	177.679	143.324	29.228	2.474	32	1
RONDÔNIA	14.497	13.766	605	49	-	-
PORTO VELHO	9.134	8.719	391	24	-	-

Fonte: Brasil, 2013.

Nota: V = *P. vivax*; F = *P. falciparum*; F+V = *P. falciparum* e *P. vivax*; M = *P. malariae*; O = *P. ovale*.

1.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MALÁRIA

Historicamente foram várias as políticas de estratégia de controle criadas pelos órgãos de vigilância em saúde para tentar controlar a doença.

Desde o final do século XIX, com trabalhos de Adolfo Lutz, e início do século XX (1905) quando foi comprovada a transmissão intradomociliar da malária por Carlos Chagas, foram criadas campanhas para tentar eliminar ou reduzir o número de casos de malária no Brasil, como por exemplo, o Serviço de Malária criado no Nordeste na década de 1930 que foi importante para eliminar a epidemia da malária causada pelo *A. gambiae* principalmente no Rio Grande do Norte e Ceará (SILVEIRA e REZENDE, 2001).

Outra tentativa criada pela Organização Mundial de Saúde a partir do ano 1940 para tentar controlar o vetor da doença e tentar diminuir o número de casos de malária foi a implantação do inseticida Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). A estratégia foi importante para diminuir o número de casos de malária, mas não foi suficiente para eliminar a malária na Amazônia Legal, muito porque os técnicos da época não contavam com a adaptação do vetor. Na década de 60, foi criada a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), onde os esforços eram concentrados principalmente no controle vetorial. A campanha mostrou-se eficiente porque serviu para reduzir o número de casos de malária, já que na década de 40 foram registrados quase 5 milhões de casos, e após a criação da CEM foram registrados 52 mil casos no ano de 1970 (DEANE, 1992; BRASIL, 2003).

No final da década de 1980 e início dos anos de 1990 ocorreu o surgimento do Projeto de Controle da Malária na Bacia Amazônica (PCMAN) com intuito de diminuir a incidência da malária na Amazônia. Um marco importante para o controle

da doença foi a realização da Conferência Interministerial de Amsterdã em 1992 patrocinado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A partir desse evento houve uma nova idéia de estratégia para controle da malária com foco principalmente no indivíduo doente e com objetivos direcionados no pronto diagnóstico e no tratamento rápido dos casos de malária, além do controle vetorial, fortalecimento da vigilância epidemiológica, prevenção de restabelecimento da transmissão da doença, dentre outros (LOIOLA, SILVA e TAUIL, 2002).

Devido ao aumento da incidência da malária em 1999, o Ministério da Saúde cria o Plano de Intensificações de Ações de Controle da Malária (PIACM) com objetivo de reduzir a malária em 50% na região da Amazônia Legal até o final do ano de 2001. A ação foi muito importante, pois serviu para expandir as redes de diagnósticos nas áreas endêmicas proporcionando tratamento rápido para pacientes dessas localidades. Com isso, a incidência da malária reduziu consideravelmente na maioria dos Estados que compõe a Amazônia Legal (TAUIL, 2002; BRASIL, 2003).

Com objetivo de dar continuidade aos avanços proporcionados pelo PIACM, o Ministério da Saúde instituiu o Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM), com idéia de tornar permanente a ação, expandir e estruturar os serviços de saúde para além da região amazônica. Dentre os principais objetivos do PNCM para o controle da malária estão: (i) diagnóstico e o tratamento precoce com a implementação de métodos de diagnóstico rápido para doença e criação de controle de qualidade com intuito de subsidiar os serviços de saúde, (ii) mobilização política e social, (iii) estruturação dos sistemas de serviços de saúde e também (iv) capacitação dos recursos humanos com realização de cursos periódicos para todo o corpo técnico (BRASIL, 2004).

A criação do PNCM permitiu a expansão da rede de diagnóstico principalmente nas áreas remotas facilitando o acesso da população aos serviços de diagnóstico da doença.

A OMS e os programas de controle da malária dos países onde a doença é endêmica orientam como elementos básicos na estratégia de controle da malária, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos suspeitos (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

1.4 DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS

A ausência de sintomatologia clínica específica que permitam confirmar a malária faz com que sejam necessários outros métodos de diagnósticos para confirmar a infecção (BRUCE-CHWATT, 1985; KNELL, 1991).

O diagnóstico incorreto pode tornar a malária muitas vezes fatal e elevar os custos do tratamento da doença. O diagnóstico preciso é de grande importância nos processos de triagem e vigilância, e ajuda na diminuição do uso indiscriminado de medicamentos antimaláricos para que não ocorra a ampliação da resistência aos fármacos (BELL e PEELING, 2006; MURRAY e BENNETT, 2009; FEACHEM et al., 2010; MOONEN et al., 2010).

Vários métodos de diagnósticos laboratoriais para malária podem ser empregados, porém a sensibilidade e especificidade podem variar entre as técnicas. Dentre essas, o método da gota espessa (GE) é considerado pelo Ministério da Saúde o diagnóstico padrão-ouro para malária. Porém, outras técnicas são aplicadas, como por exemplo, o capilar Quantitativo *Buffy Coat* (QBC) que também é baseada na microscopia para visualização do parasito e necessita de corantes fluorescentes (laranja de acridina). Técnicas baseadas na reação antígeno-anticorpo também são bem difundidas, tais como; o imunoenzimático, imunofluorescência direta e indireta e testes rápidos (RDTs) baseados na imunocromatografia. Métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que apresentam sensibilidade e especificidade superior às outras técnicas citadas, estão sendo muito utilizadas para a identificação de pacientes assintomáticos e para fins acadêmicos. Entretanto, por se tratar de uma técnica complexa e de alto custo, torna-se difícil sua aplicação na rotina (ÁVILA e FERREIRA, 2009).

No presente estudo serão descritos os métodos laboratoriais: GE, PCR e RDT que foram utilizados para análise de concordância e avaliação de alguns parâmetros de desempenho.

1.4.1 Método tradicional de diagnóstico da malária (Gota espessa)

O método tradicional de diagnóstico da malária é o exame da GE considerado o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da doença. O exame da GE apresenta baixo custo e pode apresentar boa sensibilidade pelo fato de concentrar o sangue de 20 a 30 vezes mais por campo microscópico, podendo favorecer o encontro do parasita (ÁVILA e FERREIRA, 2009; BRASIL, 2009).

Na técnica da GE, vários fatores podem influenciar no resultado por microscopia, pois um bom diagnóstico depende da qualidade de coloração das lâminas, condições do microscópio, técnica de preparação das lâminas, carga horária de trabalho, formação e competência do profissional (DOWLING e SHUTE, 1966; DURRHEIN et al., 1997; KILLIAN et al., 2000; MAGUIRE et al., 2006).

Quando o procedimento de rotina é bem executado como, por exemplo, boa qualidade na coloração das lâminas de GE com etapa de desmoglobinização correta e microscopistas bem treinados, o método pode apresentar alta sensibilidade com detecção de 5-10 parasitos/ μ L de sangue (WHO, 1999).

Uma lâmina mal confeccionada pode formar artefatos que se confunde com parasito da malária, podendo gerar sujeiras e manchas, precipitados e restos celulares, além de outros microrganismos como bactérias e fungos e até mesmo componente sanguíneo (plaqueta) podem ser fatores de confusão do diagnóstico por microscopia, podendo levar a resultados falsos positivos comprometendo a especificidade do método (STOW et al., 1999; HOUWEN, 2002; MCKENZIE et al., 2003).

De acordo com Di Santi et al., (2004) mesmo nos mais sofisticados centros de diagnóstico de malária, a GE pode não ser capaz de diferenciar as espécies *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* devido a similaridade morfológica dos parasitos.

Diante disso, a aplicação de microscopia aperfeiçoada, boa qualidade dos corantes biológicos para a identificação das espécies e quantificação parasitológica, pode tornar o procedimento viável, simples e rápido, com sensibilidade 80% e especificidade 90%. Porém, tem-se discutido a baixa sensibilidade do método nos casos de baixa parasitemia e infecções mistas, principalmente quando uma espécie

de *Plasmodium* se apresenta com densidade menor que outra (KILLIAN et al., 2000; MANSO, 2004; LORENZETTI et al., 2008).

1.4.2 Diagnóstico molecular da malária (PCR)

Nos últimos anos, vários métodos de diagnósticos para malária vêm sendo empregados, visando uma maior sensibilidade e especificidade. Métodos moleculares tem sido uma ferramenta importante na detecção do parasito da malária. A PCR permite diferenciar com segurança as espécies de plasmódios pela amplificação de regiões alvos de seus genes (MANSO, 2004).

Vários estudos que visam comparar o melhor método de diagnóstico para malária, vêm demonstrando uma melhor sensibilidade e especificidade em técnicas que utilizam PCR, quando comparados aos métodos imunológicos e microscópicos, e por isso, é o diagnóstico mais indicado para rastreamento em bancos de sangue e em casos suspeitos de malária onde o diagnóstico de rotina não apresente resultado positivo (KIMURA et al., 1997; HANSCHIED, 1999; HANSCHIED, VALADAS e GROBUSH, 2002; ALI et al., 2005).

Costa et al., (2008), avaliou o desempenho da técnica PCR no diagnóstico da malária comparando com os resultados da GE. O autor observou que a positividade global para infecção malárica foi maior para a PCR 68,3%, já para a GE foi 35,7%. Na ocorrência de infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) a GE detectou 1,1% e a PCR 14,8%, mostrando uma melhor sensibilidade e especificidade pelo método molecular.

A técnica de PCR vem se mostrando uma ótima ferramenta diagnóstica, porém o alto custo dos equipamentos e insumos, protocolos complexo e exigência de pessoal técnico bem treinado, dificultam sua aplicação na rotina. Mas, essa é uma técnica de grande importância também no controle da doença e principalmente na detecção de infecções mistas (SNOUNOU et al., 1993(a); BLACK et al., 1994; SINGH et al., 1996). Resultados falsos negativos podem ocorrer quando o isolamento do Ácido Desoxiribonucléico (DNA) não é feito corretamente, cujos inibidores da amostra podem bloquear a ação das enzimas importantes na reação (MAKLER, PALMER e AGER, 1998; FARNERT et al., 1999).

1.4.3 Diagnóstico por teste rápido baseado na imunocromatografia (RDTs)

Muitas vezes realizar o diagnóstico da malária se torna impraticável, devido à precariedade dos serviços de saúde e dificuldade da população acessar os locais de diagnósticos. Em lugares com alta endemicidade onde há falta de infra-estrutura e pessoal qualificado para realizar o exame baseado na microscopia, os Rapid Diagnostic Tests (RDTs) surgem como alternativa diagnóstica, pois não necessitam de equipamentos e recursos humanos tão especializados (PALMER et al., 1998; NEVES, 2005).

Alguns RDTs baseados no princípio da imunocromatografia têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Os derivados protéicos maláricos que funcionam como alvos antigênicos encontrados em sangue periférico infectados são detectados geralmente por anticorpos monoclonais. Dessa maneira, o sangue periférico infectado com *Plasmodium spp.* migra sobre uma membrana de nitrocelulose sensibilizada com anticorpos monoclonais e/ou policlonais acoplados a partícula de ouro, assim os anticorpos fixos na membrana detectam o antígeno específico e produz uma linha com coloração visível (MOODY, 2002).

Os RDTs disponíveis são de simples execução e permitem uma rápida análise das amostras biológicas. Uma das principais vantagens dos RDTs é que os resultados podem ser obtidos entre 10 a 20 minutos, mas seu alto custo e baixa sensibilidade dificultam sua aplicação (MURRAY et al., 2003; BELIZÁRIO et al., 2005; SEED et al., 2005).

Grande parte dos RDTs para malária são utilizados para detectar de forma mais específica a espécie *P. falciparum* e as outras espécies de malária de forma não específica (RODULFO et al., 2007).

Comumente os RDTs detectam a proteína 2 rica em histidina (HRP-2) para espécie *P. falciparum*, sendo essa proteína o primeiro antígeno alvo utilizado em RDT. A enzima lactato desidrogenase plasmodial (pLDH) é utilizada para identificar as espécies *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum* (MOODY, 2002; BELL e PEELING, 2006; MOHON et al., 2012; KOSACK et al., 2013).

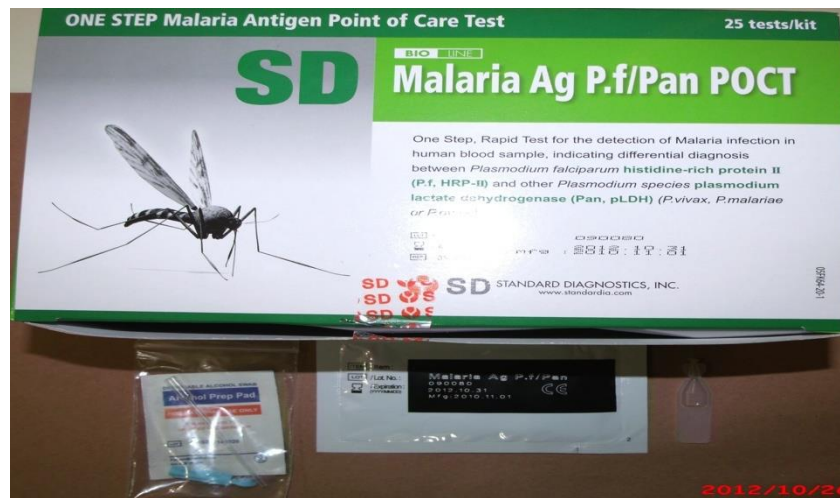
A HRP-2 é uma proteína solúvel e expressa exclusivamente pelo *P. falciparum* nos estágios sanguíneos assexuados e gametócitos jovens (PARRA et al., 1991; ÁVILA e FERREIRA, 2000). Essa proteína possui algumas desvantagens podendo gerar resultados falsos positivos devido à persistência no organismo depois de alguns dias após a cura da doença (IQBAL et al., 2004; FOGG et al., 2008), como também por ser um resíduo metabólico do parasito, a HRP-2 não permite identificar uma infecção ativa sendo assim, preterida para monitorar a terapia com drogas (MAKLER et al., 1998; PIPER et al., 1999).

A pLDH parece ser menos sensível que a HRP-2, um ponto importante a destacar sobre a pLDH é que rapidamente a enzima é eliminada da corrente sanguínea, podendo ser indetectável já por volta de uma hora após o tratamento, sendo ótimo para monitoramento de tratamento (ODUOLA et al., 1997; PIPER et al., 1999).

O RDT SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT (RDT-SB) - *Standard Diagnostics* – Coréia, surgiu como uma nova alternativa diagnóstica para a doença. O RDT-SB é um imunoteste rápido qualitativo de três linhas, é disponibilizado no mercado em forma de “cassete” e contém uma faixa de membrana de nitrocelulose com anticorpos distribuídos em pontos diferentes, contendo anticorpo monoclonal específico para HRP-2 de *P. falciparum* e anticorpo policlonal específico para detecção da pLDH das demais espécies de *Plasmodium* causadores da malária humana.

A idéia de obtenção de diagnóstico rápido como forma de controle da doença fez com que fossem desenvolvidos vários trabalhos que verificassem a acurácia diagnóstica dos RDTs. Nesse contexto, alguns autores avaliaram o desempenho do RDT-SB e observaram bons resultados em seus estudos com boa sensibilidade e especificidade (KIM et al., 2008; FAYE et al., 2013; MENDOZA et al., 2013; TROUVAY et al., 2013).

Figura 2: Kit comercial RDT-SB (Standard Diagnostics, Inc).



Fonte da imagem: O autor.

Os órgãos de vigilância em saúde recomendam o diagnóstico precoce e de qualidade como um dos pilares essenciais para o controle da malária. Diante da importância a respeito da implementação de um método de diagnóstico rápido como forma de subsidiar os serviços de saúde para o controle da malária, o presente trabalho visou avaliar o desempenho do RDT-SB quando aplicado em uma área endêmica da Amazônia Legal por meio de análise da sensibilidade, especificidade, comparando os resultados do teste com o método tradicional GE e com a PCR.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o desempenho do teste imunocromatográfico SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT em uma área endêmica para malária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade do teste SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT;
- Avaliar a especificidade do teste SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT;
- Verificar a concordância dos resultados obtidos pelo teste SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT em relação à gota espessa e PCR;
- Avaliar o custo benefício da aplicação do teste SD Bioline Malaria Ag P.f/ Pan POCT no diagnóstico da malária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Malária do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) no município de Porto Velho, Rondônia, no período de Outubro de 2012 a Agosto de 2014.

3.2 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse estudo foi aprovado sob o parecer número 146.387 e CAAE: 07738212.4.0000.5541.

O presente trabalho teve apoio do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq (Processo 555652/2009-2) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), PRONEX-Rede Malária, Mato Grosso.

Foram incluídos todos os pacientes com idades entre 18 e 60 anos, que aceitaram participar do estudo.

Foram excluídos do presente estudo:

- a) crianças e pessoas com idade inferior a 18 anos;
- b) adultos acima de 60 anos;
- c) da etnia indígena;
- d) gestantes;
- e) pessoas com outras patologias degenerativas e as que não aceitaram participar do estudo.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Todos os pacientes que procuraram Serviço de Diagnóstico de Malária do CEPEM com sintomatologia clínica da malária foram convidados a participar voluntariamente do estudo. Após o aceite do participante e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi realizada coleta do material biológico.

3.3.1 Coleta de sangue e armazenamento da amostra

Para realização dos exames de malária, foi coletado sangue por punção digital para confecção da lâmina de GE conforme descrito no item 3.4.1, e uma alíquota de 5 mL de sangue periférico para realização dos exames de teste de diagnóstico rápido (RDT) e por PCR.

As amostras obtidas foram acondicionadas em tubos contendo anticoagulante Etileno DiaminoTetracético (EDTA) e conservadas em temperatura entre 4°C a 8°C até o momento da execução dos exames, por um tempo não superior a 4 horas para evitar a hemólise e encaminhadas ao Laboratório de Epidemiologia do CEPEM/FIOCRUZ - Rondônia, para o processamento e análise.

Foram utilizadas alíquotas de 10 µL de sangue total para confecção das lâminas de gota espessa e distendido sanguíneo. Para realização dos exames pelo RDT-SB alíquotas de 5 µL, e 300 µL para o preenchimento do papel de filtro para extração do gDNA plasmodial. O restante da alíquota de sangue foi separado em microtubos de 1,5mL (eppendorf), e armazenado em biorrepositório do laboratório de Epidemiologia CEPEM/FIOCRUZ- Rondônia.

Os exames pelos métodos da GE e RDT-SB foram realizados no Laboratório de Epidemiologia da Malária e os exames de PCR realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular, ambos localizados dentro da área física do CEPEM.

Os pacientes que obtiveram resultado positivo para malária na GE, foram encaminhados para avaliação médica e medicação correspondente à espécie parasitária.

3.4 CONFECÇÃO DA GOTA ESPESSA, DISTENDIDO SANGUÍNEO E ETAPAS DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

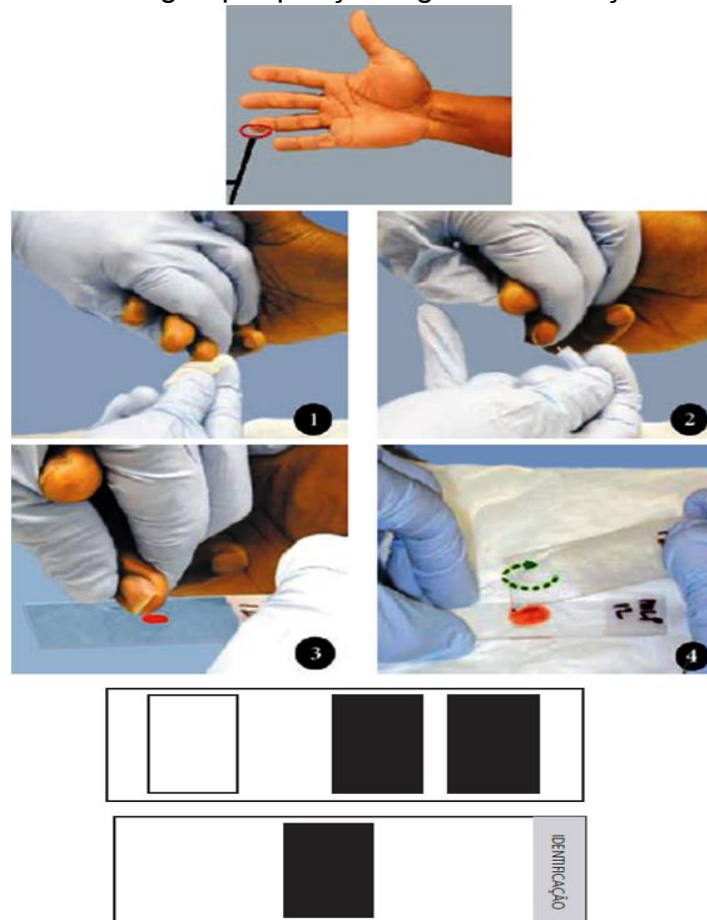
3.4.1 Gota espessa

As etapas de confecção da GE, distendido sanguíneo e coloração das lâminas se deu de acordo com as recomendações do Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária (BRASIL, 2009).

Para obtenção das lâminas de GE foram utilizadas duas lâminas limpas, sendo uma identificada com os dados do paciente (nome e registro). No procedimento de confecção da lâmina foram adotados os seguintes passos, conforme rotina estabelecida (ilustrados na figura 3):

1. Preencher a ficha Sivep - Malária e Identificar a lâmina de vidro com registro do paciente.
2. Escolher a falange, dando preferência ao dedo médio.
3. O local da punção deve ser na lateral da falange distal, evitando executar a punção no centro da polpa digital.
4. Fazer assepsia do local da punção utilizando algodão embebido em álcool 70%.
5. Proceder à punção com um único movimento firme e rápido utilizando lanceta estéril e descartável.
6. Desprezar a lanceta em recipiente próprio.
7. Exercer leve compressão na polpa digital, até que a primeira porção de sangue flua.
8. Confeccionar uma lâmina, devidamente identificada, de gota espessa para pesquisa de *Plasmodium*.
9. Limpar o local da punção com algodão embebido em álcool 70%. Manter o algodão no local da punção, solicitando ao paciente segurá-lo entre as pontas dos dedos.
10. Aguardar a amostra de sangue secar na lâmina.
11. Aplicar coloração, segundo método de Walker, com corante de Giemsa.
12. Observar em objetiva de imersão sob aumento final de 1000X.
13. Realizar contagem de parasitos encontrados em 200 leucócitos visualizados.
14. Anotar o resultado em ficha própria. O resultado da parasitemia pelo método da GE se deu na forma qualitativa (em cruces), e o resultado do distendido sanguíneo na forma quantitativa (em mm^3).

Figura 3: Coleta de sangue por punção digital e confecção da gota espessa.



Fonte: Manual de diagnóstico laboratorial da Malária (BRASIL, 2009), adaptado.

3.4.2 Coloração das lâminas pelo método de Walker

Na primeira fase ocorreu o processo de desemoglobinização das hemácias utilizando a solução hipotônica de azul de metileno fosfatado (Dinâmica). Foi aplicada a referida solução por dois segundos, posteriormente a lâmina foi lavada com solução tampão de fosfatos (água tamponada), contendo os sais Fosfato de potássio monobásico (4,0g) e Fosfato de sódio bibásico (6,0g) dissolvidos em 1.000 mL de água destilada.

O segundo passo se deu pela coloração da lâmina pela solução de Giemsa (Laborclin®). A solução foi preparada na proporção de uma gota de corante Giemsa (aproximadamente 50 µL) para 1 mL de água tamponada e então homogeneizada. O lado da lâmina contendo a amostra de sangue foi colocado para a superfície de uma placa contendo o corante Giemsa. Após a aplicação da solução na placa côncava de coloração sob a lâmina invertida, esperou-se por 10 minutos e então

houve etapa de lavagem da lâmina. Posteriormente, ocorreu a etapa de secagem da lâmina em temperatura ambiente para que fosse feita a visualização microscópica (BRASIL, 2009).

3.4.3 Preparo do distendido sanguíneo

Uma pequena gota de sangue (10 μ L) foi transferida para uma lâmina identificada com o registro do paciente, e utilizando outra lâmina distensora fez-se o distendido sanguíneo por meio de deslocamento rápido, formando uma camada fina (Figura 4).

Figura 4: Imagem de um distendido sanguíneo.



Fonte: Manual de diagnóstico laboratorial da Malária (BRASIL, 2009).

3.4.4 Coloração da lâmina do distendido sanguíneo

Na coloração do distendido sanguíneo aplicou-se o método de Giemsa. O distendido sanguíneo foi fixado com álcool metílico (Newprov) por um minuto, após a secagem da lâmina foi colocada invertida sobre uma placa côncava contendo o corante Giemsa, esperou-se um tempo entre 20 a 30 minutos para coloração da lâmina, e então utilizando água tamponada foi feito o enxágue da mesma. O corante foi preparado na mesma proporção apresentado no item 3.4.2.

De maneira geral e conforme a rotina do serviço de saúde, todo paciente com suspeita de malária foi submetido ao exame microscópico da gota espessa de sangue corada pelo Giemsa, para pesquisa de hematozoários. Esse exame foi realizado por um técnico de microscopia do CEPEN/FIOCRUZ-Rondônia devidamente treinado e qualificado para essa técnica, o qual já é responsável pelo diagnóstico de malária. Outro técnico coletou uma alíquota de 5 mL de sangue periférico e confeccionou nova lâmina de GE e uma lâmina de distendido sanguíneo,

para averiguação do diagnóstico por outro microscopista de reconhecida expertise, do CEPEM/FIOCRUZ-Rondônia.

O resultado da GE se deu na forma qualitativa em cruces pela contagem de parasitos em 200 campos microscópicos. Já o resultado do distendido sanguíneo se deu por meio da obtenção da contagem global de leucócitos do paciente, e então foi determinada quantitativamente a parasitemia por milímetros cúbicos de sangue (BRASIL, 2001).

A observação se deu por microscópio óptico com objetiva de imersão de 1000X. Nos casos positivos, a parasitemia foi expressa em cruces, conforme padrão Ministério da Saúde (LUZ e FERNANDEZ-RAMIREZ, 1990), e em milímetros cúbicos (Tabela 1).

Tabela 1: Parasitemia da malária utilizada pelo Ministério da Saúde.

Parasitemia por campo	Parasitemia qualitativa (cruces)	Parasitemia quantitativa (mm ³)
40 a 60 / 100 campos	+/2	200 a 300
1 / campo	+	301 a 500
2 a 20 / campo	++	501 a 10.000
21 a 200 / campo	+++	10.001 a 100.000
Acima de 200 / campo	++++	Acima de 100.000

Fonte: Luz e Fernandez-Ramirez (1990).

3.5 PROCEDIMENTO DE REALIZAÇÃO DO EXAME PELO RDT-SB

Os RDTs utilizados no presente estudo foram fabricados por Standard Diagnostics, Inc- Coréia. Estão disponíveis como Kits comerciais **SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT (RDT-SB)**. O estudo consistiu da avaliação dos resultados dos Kits de um mesmo lote (090079).

Os RDT-SB são baseados na detecção por imunocromatografia da HRP-2 ou pLDH. Os testes são individuais, em forma de cassetes, constituídos por uma fita de nitrocelulose impregnada com antígenos específicos (pLDH e HRP-2), possuindo três faixas, (i) uma faixa teste controle com anti-IgG de Cabra; (ii) uma faixa teste P.f com anticorpo monoclonal de camundongos específicos para HRP-2 do *P. falciparum* e (iii) uma faixa teste Pan, com anticorpos policlonais de camundongo anti pLDH para identificação das espécies de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Para a

realização do exame pelo RDT-SB seguiu-se a técnica recomendada pelo fabricante.

Os RDT-SB foram armazenados em temperatura ambiente, entre 27°C a 30°C, até o momento da realização dos exames. De acordo com o fabricante a temperatura não deve ultrapassar os 40°C.

Os RDT-SB contêm os seguintes componentes: (i) Um dispositivo de teste com um desidratante; (ii) Um diluente para ensaio; (iii) Um aplicador descartável para amostra; (iv) Uma lanceta e um esfregão embebido em álcool a 70%.

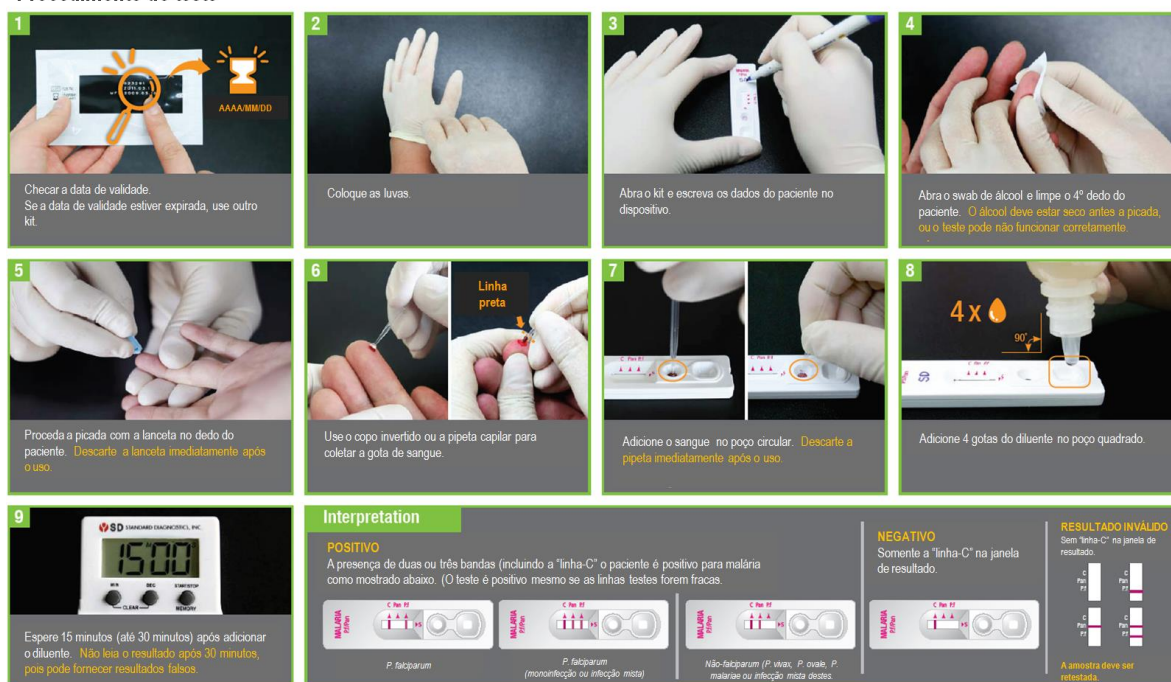
Procedimento para realização do Exame pelo RDT-SB:

Para esse exame foi utilizada uma alíquota de 5 µL de sangue total obtida pela punção digital de sangue periférico. Esse volume sanguíneo foi transferido para o orifício circular do dispositivo específico para a amostra. Posteriormente foram adicionadas quatro gotas do diluente no orifício quadrado específico para diluente (Figura 5). O tempo de leitura dos resultados foi de 15 a 30 minutos. Nenhum resultado foi anotado após o tempo citado, de acordo com as recomendações do fabricante.

Os resultados dos RDT-SB foram comparados com os resultados da GE e PCR e observados em análise de concordância, verificando a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Figura 5: Esquema das etapas para realização do exame pelo RDT-SB.

Procedimento do teste



Fonte: Standard Diagnostics, Inc. (Adaptado).

3.6 PREPARO E EXTRAÇÃO DE DNA EM PAPEL DE FILTRO PELO MÉTODO FENOL-CLOROFÓRMIO

Após a coleta de sangue por punção venosa periférica e antes do sangue ser transferido para o tubo contendo anticoagulante EDTA, aproximadamente 300 μ L de sangue total foi utilizado para o preenchimento do papel de filtro (Whatman® 3MM 46x57cm- Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), que são distribuídos em quatro círculos com circunferência de 2 cm.

Seguindo o protocolo de Evengård et al., (1988), inicialmente foi cortado 1 círculo em tiras unidas e depois armazenados em microtubo de plástico 1,5 mL (eppendorf). Posteriormente, foi utilizado 1 mL de Salina Tamponada fosfatada - PBS 1X (1,4 M Cloreto de sódio, 0,074 M Fosfato dissódico, 0,025 M Fosfato monossódico hidratado - Dinâmica, Brasil), com saponina a 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após a adição desses componentes deixou-se a 37°C em estufa microbiológica durante o período de 16 horas. No dia seguinte, o microtubo foi homogeneizado no vórtex e centrifugado a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, depois da etapa de centrifugação o sobrenadante foi desprezado. Na

sequência, foram repetidas as etapas: lavagem (PBS 1X); agitação (vórtex); centrifugação 12.000 rpm e descarte do sobrenadante. Após essa fase, foi realizada uma nova etapa de centrifugação e parte do líquido foi desprezado, deixando aproximadamente 100 µL no microtubo. Em seguida foram adicionados 60 µL do tampão de lise (40 mM Hidroximetil aminometano cloridrato - Tris-HCl pH 8.0, 80 mM EDTA, Dodecil Sulfato de Sódio- SDS a 0,2% - Dinâmica, Brasil) e 150 µL de Proteinase K 2 mg/mL (Invitrogen®, Carlsbad, EUA), e logo foi incubado a 37°C em estufa bacteriológica deixando por tempo máximo de 16 horas. Depois do período de incubação, foi adicionado 300 µL de água estéril milli-Q autoclavada e 500 µL de fenol equilibrado (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), e então homogeneizado por inversão (10 vezes). Logo depois, o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm e a parte aquosa foi removida para outro microtubo. Posteriormente foi adicionado 250 µL de fenol equilibrado e o mesmo volume de clorofórmio (Dinâmica, Brasil). Novamente foi submetido à centrifugação 12.000 rpm por 10 minutos e uma nova etapa de remoção da fase aquosa para novo microtubo. Depois foram adicionados 45 µL de acetato de sódio na concentração (3M pH 5) e mais 1 mL de etanol PA gelado (Dinâmica, Brasil), em seguida, homogeneizou-se por inversão (10 vezes) e foi reservado a 20°C negativos por no mínimo 4 e máximo 16 horas. Após esse período, o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e então, o etanol foi descartado, deixando um volume aproximado de 100 µL no microtubo. Na fase final foram adicionados mais 800 µL de etanol a 80% gelado e centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e novamente o etanol foi descartado. Após o descarte deixou-se secar por aproximadamente 2 horas.

Por fim, foram adicionados 100 µL de água milli-Q autoclavada para ressuspender o DNA. Esperou-se por aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente, e o DNA purificado foi armazenado a 4°C. Posteriormente foi observado à quantidade e qualidade em espectro de absorbância e gel de agarose a 0,8% antes da análise por PCR.

3.7 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DOS CONTROLES

O procedimento de extração das amostras controles seguiu o mesmo procedimento mencionado anteriormente no item 3.6. Como controle positivo foram

utilizadas amostras positivas na GE para *P. vivax* e *P. falciparum* de pacientes que procuraram o serviço de diagnóstico de malária do CEPEN e que aceitaram participar do estudo. O controle negativo foi obtido de pacientes que relataram nunca ter contraído malária e que apresentaram resultado negativo para o método da GE.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DO gDNA

As amostras obtidas no presente estudo, após o processo de extração de DNA, foram quantificadas utilizando aparelho espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo scientific Uniscience), para que fosse determinada a quantidade e qualidade do material genético presente na amostra. Também foi observada a qualidade do gDNA por meio da técnica de eletroforese em gel, no qual foi utilizado gel de agarose a 0,8% (LE- Bio América). A visualização do material genético se deu em equipamento de fotodocumentação L-PIX (Loccus biotecnologia).

3.9 TÉCNICA PCR PARA MALÁRIA

A PCR foi realizada baseada no protocolo de Snounou modificado (Snounou,1996), utilizando óligos já descritos e validados.

O alvo da amplificação é uma região do gene o qual codifica a pequena subunidade ribossomal do RNA (ssrRNA) que é específica para gênero *Plasmodium*, cujo fragmento possui 1200pb. Esse gene possui regiões com sequência conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium* e que são específicas para cada espécie.

Foram analisadas as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* e os óligos utilizados nos ensaios amplificam gênero e são espécie-específica. Do DNA ressuspendidos foi utilizado 1 µL na primeira reação Nest-1 gênero *Plasmodium*. Para essa reação foi utilizado volume final de 20 µL, e contendo os seguintes reagentes: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados-dNTPs (2,5 mM) concentração final 0,125 mM (Invitrogen/Life Technologies Foster City, CA, EUA), enzima Taq DNA polimerase (5U/µL) concentração final 0,4 U/µL (Kappa Biosystem, Boston, MA, EUA), Tampão de PCR 10x utilizando concentração final 1x, Cloreto de Magnésio (MgCl₂) (50 mM)

concentração final 1 mM fornecido pelo fabricante da enzima e oligo rPlus 5 e rPlus 6 (2,5 µM) concentração final 250 nM (IDT/DNA Technologies, IOWA, EUA).

Na segunda reação Nest-2 que é espécie-específica, foram utilizados os mesmos reagentes com as mesmas concentrações, porém ao invés de utilizar o oligo rPLUS-5 e rPLUS-6 para gênero, foi utilizado para *P. vivax* os oligos *P. vivax* I e *P. vivax* II (2,5 µM) concentração final 250 nM. Para o *P. falciparum* foram utilizados os oligos *P. falciparum* I e *P. falciparum* II (2,5 µM) concentração final 250 nM. A sequência dos oligos utilizados gêneros específicos e espécie - específicos são descritos no quadro 2.

Quadro 2: Óligos utilizados nas reações PCR do estudo.

Especificidade	Nome	Sequência	Tamanho
Gênero <i>Plasmodium</i> Nested 1	rPlus 5 rPlus 6	5'-CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3' 5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3'	~1.2 kb
Espécie <i>P. falciparum</i> Nested 2	rFAL 1 rFAL 2	5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3' 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'	205 pb
Espécie <i>P. vivax</i> Nested 2	rVIV 1 rVIV 2	5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3' 5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'	120 pb

Fonte: SNOUNOU, 1996.

Para o processo de amplificação utilizou-se um termociclador Veriti® 96 Well Fast Thermal Cyclor da Applied Biosystems®. O número de ciclos e programação de temperaturas por espécie de *Plasmodium* são demonstrados no quadro 3. Os resultados foram observados em gel de agarose em 1,5 %, e visualizados utilizando o equipamento L-PIX (Loccus biotecnologia).

Quadro 3: Condições de ciclagem da temperatura de desnaturação, anelamento e extensão para o gênero e espécies de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*.

Caracterização de gênero (Nest 1)	Caracterização da espécie P.f (Nest 2)	Caracterização da espécie P.v (Nest 2)
- 1 ciclo: 95°C = 5min, (desnaturação) 58°C = 2min, (anelamento) 72°C = 2min; (extensão)	- 1 ciclo: 95°C = 5min, (desnaturação) 58°C = 2min, (anelamento) 72°C = 2min; (extensão)	- 1 ciclo: 95°C = 5min, (desnaturação) 65°C = 2min, (anelamento) 72°C = 2min; (extensão)
- 30 ciclos: 94°C = 1min, (desnaturação) 58°C = 2min, (anelamento) 72°C = 2min; (extensão)	- 30 ciclos: 94°C = 1min, (desnaturação) 58°C = 2min, (anelamento) 72°C = 2min; (extensão)	- 30 ciclos: 94°C = 1min, (desnaturação) 65°C = 2min, (anelamento) 72°C = 2min; (extensão)
- 1 ciclo: 58°C = 2min, (anelamento) 72°C = 5min. (extensão)	- 1 ciclo: 58°C = 2min, (anelamento) 72°C = 5min. (extensão)	-1 ciclo: 65°C = 2min, (anelamento) 72°C = 5min (extensão)

P.f= *Plasmodium falciparum*; P.v= *Plasmodium vivax*.

3.10 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DA PCR

Outra análise realizada foi a verificação do limiar de detecção pela técnica de PCR por meio do teste de sensibilidade do método.

Para realizar esse teste foi utilizada uma amostra de paciente positivo para malária, cujo resultado em lâmina foi duas cruzes para *P. vivax*. Em seguida foi confeccionada uma lâmina de distendido sanguíneo e realizada a contagem de parasitos/ μL baseada na leucometria do paciente obtida em equipamento automático de hematologia KX-21N SYSMEX.

De acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária (BRASIL, 2009), foi anotado o número de parasitos encontrados até que fossem visualizados 200 leucócitos, totalizando 70 parasitos. Dessa maneira, como a leucometria observada na amostra do paciente foi de 5.150 leucócitos/ mm^3 , foram anotados 1.802 parasitos/ μL . Posteriormente, a amostra de sangue foi submetida à diluição seriada utilizando amostra de sangue de paciente livre do parasito da malária e com a mesma tipagem sanguínea. A diluição mínima utilizada foi 1/10 e a máxima 1/10⁶. O volume final usado na diluição foi de 800 μL . Foram utilizados 7 microtubos de 1,5 mL e adicionados 720 μL de sangue não parasitado. No primeiro microtubo além do volume informado de sangue não parasitado foram adicionados mais 80 μL da amostra parasitada, logo depois foi realizada uma etapa de homogeneização, em seguida foram transferidos 80 μL do sangue ao segundo microtubo e assim sucessivamente. No último, foi desprezado 80 μL da amostra diluída para que todos ficassem com o mesmo volume final.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para avaliar a concordância entre os exames de malária realizados: GE, RDT-SB e PCR foi utilizado o Índice KAPPA. O Coeficiente Kappa é uma ferramenta importante e pode ser definido como uma medida de associação usada para descrever e testar o grau de concordância, ou seja, a confiabilidade e precisão na classificação (JOHNSON E KOTZ, 1983).

A tabela 2 demonstra a escala de concordância do KAPPA, que como observado, quanto mais próximo de 1 for o índice, melhor a concordância entre os métodos.

A fórmula do teste Kappa é dado por:

$$Kappa = \frac{P_o - P_E}{1 - P_E}$$

onde:

$$P_o = \frac{\text{número de concordâncias}}{\text{número de concordâncias} + \text{número de discordâncias}}$$

$$P_E = \sum_{i=1}^n (p_{i1} \times p_{i2})$$

- n é o número de categorias;
- i é o índice da categoria (que vale de 1 a n);
- p_{i1} é a proporção de ocorrência da categoria i para o avaliador 1;
- p_{i2} é a proporção de ocorrência da categoria i para o avaliador 2;

Tabela 2: Escala de concordância do KAPPA.

KAPPA	Concordância
< 0,00	Nenhuma
0,00 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Sofrível
0,41 - 0,60	Regular
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Adaptado de Londis e Koch, 1977.

No presente estudo foram comparados os resultados obtidos no RDT-SB com a GE e PCR por meio de um quadro de contingência (Quadro 4), e verificado o desempenho do RDT-SB de acordo com análise de alguns parâmetros tais como:

sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, dentre outros. Para calcular esses índices foi utilizado um software denominado Medcalc®.

Quadro 4: Interpretação dos resultados entre os métodos analisados por meio de quadro de contingência.

		Gota espessa/ PCR	
		+	-
RDT SD Bioline Malaria	+	VP (a)	FP (b)
	-	FN (c)	VN (d)

Nota: VP = Verdadeiro positivo; FP = Falso positivo; FN = Falso negativo; VN = Verdadeiro negativo

Fórmulas dos principais parâmetros observados de acordo com Ávila (2009), para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

A sensibilidade de um teste é a capacidade de um teste diagnosticar corretamente os indivíduos doentes, ou seja, os verdadeiros positivos.

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

A especificidade de um teste é a capacidade de um teste diagnosticar corretamente os indivíduos saudáveis, ou seja, os verdadeiros negativos.

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

O valor preditivo positivo mede a proporção de indivíduos doentes entre os positivos pelo teste.

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

O valor preditivo negativo mede a proporção de indivíduos saudáveis entre os negativos pelo teste.

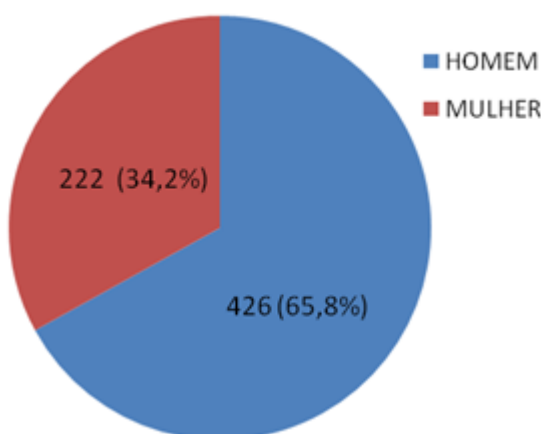
4. RESULTADOS

4.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO

O trabalho contou com a participação total de 648 indivíduos (Figura 6), sendo 426 do sexo masculino e 222 do sexo feminino. A média de idade entre os participantes variou de 18 a 60 anos. Como descrito adiante, nem todos os participantes aceitaram realizar coleta de sangue periférico.

Foram utilizadas 26 caixas de RDT-SB fornecidas pelo Ministério da Saúde, sendo que cada uma continha 25 kits individuais (POCT). Durante a realização do presente estudo, foram descartados 2 kits individuais por não estarem completos.

Figura 6: Distribuição dos participantes do estudo de acordo com o sexo.



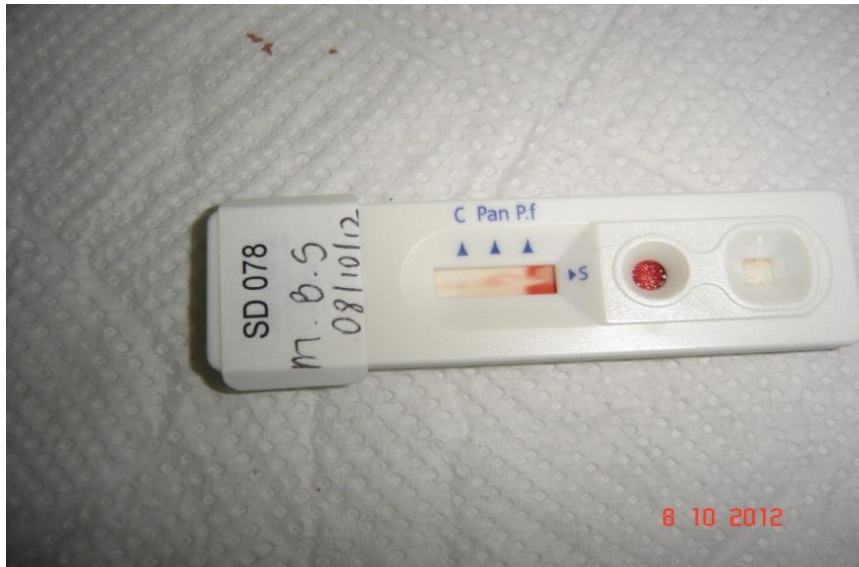
4.2 FREQUÊNCIA DOS RESULTADOS ENTRE OS MÉTODOS ANALISADOS: GOTA ESPESSA, RDT-SB E PCR.

Foram realizados 648 exames pelo método da GE e RDT-SB. Para o ensaio da PCR (Nested PCR), 4 participantes não aceitaram a coleta por punção venosa periférica, o que totalizou 644 exames realizados por este método.

Do total de exames realizados pelo RDT-SB, 56 (8,64%) apresentaram resultados inválidos. De acordo com o manual do fabricante do Kit RDT-SB, os que não apresentaram a linha controle e/ou nenhuma linha após o tempo indicado para leitura dos resultados, devem ser considerados inválidos e/ou indeterminados, como

demonstrado na figuras 5 (Material e Métodos) e 7. Dessa forma, para efeitos estatísticos, foram considerados 592 exames válidos de RDT-SB. A tabela 3 apresenta a frequência dos resultados entre os três métodos analisados.

Figura 7: Imagem de RDT-SB representativo de resultado inválido.



Fonte: Standard Diagnostics, Inc (adaptado).

Do total dos exames realizados, a GE apresentou o maior número de exames negativos (399), seguido do RDT-SB (392) e da PCR (386).

A positividade para monoinfecção por *P. vivax* pelo método da GE foi de 229/648 (35,3%), pelo o RDT-SB foi de 184/592 (31,1%) e pela PCR 238/644 (36,7%).

Para monoinfecção pela espécie *P. falciparum* a positividade foi de 19/648 (2,9%) pelo método da GE, 8/592 (1,4%) pelo RDT-SB, e 15/644 (2,3%) pela técnica da PCR.

Para infecções mistas (*P. vivax* + *P. falciparum*), a GE apresentou 1/648 (0,1%) exame positivo, o RDT-SB apresentou 8/592 (1,4%) exames positivos, e no método molecular PCR, 5/644 (0,8%) exames positivos.

Tabela 3: Frequência de resultados inválidos, negativos e positivos para *P. vivax*, *P. falciparum* e infecções por *P. vivax* + *P. falciparum* entre os métodos de diagnóstico: GE, RDT-SB e PCR.

Resultado	GE	SD	PCR
Negativo	399	392	386
P.v	229	184	238
P.f	19	8	15
P.v + P.f	1	8	5
Inválido	-	56	-
Não realizado	-	-	4
Total	648	648	648

GE = Gota espessa; SD = Teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/ Pan POCT; PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; P.v = Positivo para *Plasmodium vivax*; P.f = Positivo para *Plasmodium falciparum*; P.v+P.f = Positivo para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

4.3 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE O RDT-SB E A MICROSCOPIA.

Para verificar a concordância entre esses dois métodos, foram cruzados os resultados obtidos pela microscopia (linhas da tabela 4) com os obtidos pelos RDT-SB (colunas da tabela 4).

Os RDT-SB que apresentaram resultados inválidos, totalizando 56, foram excluídos da sentença de análise de concordância nas tabela 4 e 5.

Tabela 4: Análise de concordância entre o RDT-SB e a Microscopia (GE).

MICROSCOPIA	RDT SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT									
	NEG	%	P. v	%	P. f	%	P.f + P.v	%	TOTAL	%
NEG	351	98,9	4	1,1	-	-	-	-	355	100,0
P. v	39	17,9	175	80,3	-	-	4	1,8	218	100,0
P. f	2	11,1	5	27,8	8	44,4	3	16,7	18	100,0
P. f + P.v	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100,0
TOTAL	392	66,2	184	31,1	8	1,4	8	1,4	592	100,0

NEG= Negativo; P.v= Positivo para *Plasmodium vivax*; P.f= Positivo para *Plasmodium falciparum*; P.f + P.v= Positivo para as espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*.

A concordância observada entre o RDT-SB e a microscopia nos exames negativos foi de 351 (98,9%) exames. Dentre os 355 exames negativos pelo método da GE, 4 (1,1%) apresentaram resultados falsos positivos para espécie *P. vivax* pelo RDT-SB.

Entre os resultados positivos para a espécie *P. vivax*, 175 (80,3%) RDT-SB concordaram com a GE. Do total de 218 positivos para *P. vivax* pelo método da GE,

39 (17,9%) RDT-SB foram falsos negativos e 4 (1,8%) apontaram positividade para infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*).

Nos casos de infecção por *P. falciparum* a GE apresentou 18 exames positivos. Do total, 8 (44,4%) RDT-SB concordaram com a microscopia, 2 (11,1%) foram falsos negativos, 5 (27,8%) RDT-SB apresentaram positividade para espécie *P. vivax* quando no método da GE foram positivos para *P. falciparum* e 3 (16,7%) dos RDT-SB apontaram resultado de infecção por *P. falciparum* e *P. vivax*.

Por fim, foi registrado apenas 1 exame positivo para infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) pela GE, assim como pelo RDT-SB, obtendo concordância de 100%.

4.4. AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE O RDT-SB E A PCR

Nesse estudo também foi avaliada a concordância dos resultados obtidos pelo RDT-SB e a técnica molecular (Nested-PCR) como apresentado na tabela 5.

Tabela 5: Análise de concordância entre o RDT-SB e a PCR.

PCR	RDT SD Bioline Malaria Ag P.f/ Pan POCT									
	NEG	%	P.v	%	P. f	%	P.f + P.v	%	TOTAL	%
NEG	341	98,8	4	1,2	-	-	-	-	345	100,0
P.v	49	21,6	174	76,7	-	-	4	1,8	227	100,0
P.f	2	14,3	5	35,7	7	50,0	-	-	14	100,0
P.f + P.v	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0
NÃO COLETOU	-	-	1	100,0	-	-	-	-	1	100,0
TOTAL	392	66,2	184	31,1	8	1,4	8	1,4	592	100,0

NEG= Negativo; P.v= Positivo para *Plasmodium vivax*; P.f= Positivo para *Plasmodium falciparum*; P.f + P.v= Positivo para as espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*.

Dentre os 345 exames negativos pela PCR, 341(98,8%) RDT-SB concordaram com o método molecular, e 4 (1,2%) apresentaram resultados falsos positivos para *P. vivax*.

Avaliando os casos positivos para *P. vivax*, a PCR apresentou 227 exames positivos e o RDT-SB 174 (76,7%). Do total apontado pela PCR, 49 (21,6%) RDT-SB foram falsos negativos e 4 (1,8%) dos RDT-SB positivos para infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*).

A concordância entre o RDT-SB e a PCR para espécie *P. falciparum* foi de 50%, pois de 14 positivos pelo método molecular, apenas 7 RDT-SB foram positivos para essa espécie. Do total de positivos para *P. falciparum* pela PCR, 2 (14,3%) RDT-SB foram falsos negativos e 5 (35,7%) apresentaram troca de espécie parasitária no diagnóstico com positividade para espécie *P. vivax* quando no método molecular foram positivos para *P. falciparum*.

Nos casos de infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*), de 5 positivos pela PCR, 4 (80,0 %) RDT-SB concordaram com o diagnóstico molecular e 1 (20,0%) foi positivo para espécie *P. falciparum*.

4.5 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE MICROSCOPIA E A PCR

O Ministério da Saúde considera o método da GE o padrão ouro para o diagnóstico da malária, porém, estudos vêm demonstrando a importância do diagnóstico molecular para várias doenças, por se tratar de um método de reconhecida sensibilidade e especificidade. A tabela 6 apresenta a concordância dos resultados obtidos entre a microscopia (GE) e a PCR.

Tabela 6: Análise de concordância entre microscopia e a PCR.

MICROSCOPIA										
PCR	NEG	%	P.v	%	P.f	%	P.f+P.v	%	TOTAL	%
NEG	386	100,0	-	-	-	-	-	-	386	100,0
P.v	10	4,2	228	95,8	-	-	-	-	238	100,0
P.f	-	-	-	-	15	100,0	-	-	15	100,0
P.f+ P.v	-	-	-	-	4	80,0	1	20,0	5	100,0
NÃO COLETOU	3	75,0	1	25,0	-	-	-	-	4	100,0
TOTAL	399	61,6	229	35,3	19	2,9	1	0,2	648	100,0

NEG = Exames negativos; P.v = Positivo para *P. vivax*; P.f = Positivo para *P. falciparum*; P.f+P.v = Positivo para *P. falciparum* e *P. vivax*.

A PCR apresentou um total de 386 exames negativos, o mesmo observado pelo método da GE, com isso a concordância para esse parâmetro foi de 100%.

Nos casos positivos para espécie *P. vivax* a GE apontou 228 (95,8%) do total de 238 exames positivos pela PCR, e 10 (4,2%) resultados pela GE foram falsos negativos.

A concordância entre a GE e PCR para a espécie *P. falciparum* foi de 100%, ambos apresentaram 15 exames positivos. Para os casos de infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*), somente 1 (20%) exame foi confirmado pela GE, de um total de 5 registrados pela técnica PCR. Assim, foi observada baixa concordância nesse parâmetro.

4.6 ANÁLISE DE PARÂMETROS E DESEMPENHO DO RDT-SB COMPARADO À MICROSCOPIA

Para avaliar a eficiência do RDT-SB na triagem diagnóstica da malária, foram observadas estimativas de alguns parâmetros de desempenho do RDT-SB comparada com a microscopia (GE), os quais foram descritos no item 3.11, e demonstrados na tabela 7.

Tabela 7: Estimativa de parâmetros e desempenho do RDT-SB comparado com a microscopia.

	<i>P. falciparum</i>				<i>P. vivax</i>			
	MICROSCOPIA				MICROSCOPIA			
	SD	+	-	TOTAL	SD	+	-	TOTAL
Pf+ P.f/Pan		12	4	16	Pan	180	12	192
Pan+ neg		7	569	576	Pf+ P.f/Pan+ neg	39	361	400
TOTAL		19	573	592	TOTAL	219	373	592
Índice KAPPA (%; IC95%)	0,67 (0,49-0,85)				0,81 (0,76-0,86)			
Erro Padrão	0,092				0,025			
Proporção de concordância (%;IC95%)	98,10 (0,97-0,99)				91,39 (0,88-0,93)			
Sensibilidade (%;IC95%)	63,10 (38,38-83,65)				82,19 (76,47-87,02)			
Especificidade (%;IC95%)	99,30 (98,22-99,81)				96,78 (94,45-98,32)			
Razão de probabilidade positiva	90,47 (32,13-254,74)				25,55 (14,59-44,73)			
Razão de probabilidade negativa	0,37 (0,21-0,67)				0,18 (0,14-0,24)			
Prevalência da doença (%;IC95%)	3,21 (1,94-4,97)				36,99 (33,09-41,02)			
Valor preditivo positivo (%;IC95%)	75,00 (47,63-92,58)				93,75 (89,33-96,73)			
Valor preditivo negativo (%;IC95%)	98,78 (97,51-99,51)				90,25 (86,91-92,97)			
Número de concordâncias observadas	581 (98,14%)				541 (91,39%)			
Número de concordâncias esperadas	558 (94,26%)				323 (54,57%)			

SD = Teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT; neg = Negativo; Pan = Casos de infecção por *P. vivax*; P.f = Casos de infecção por *P. falciparum*; P.f/Pan = Casos de infecção por *P. falciparum* + *P. vivax*.

Por meio da utilização do KAPPA e de acordo com a tabela 2, foi observada uma menor concordância do RDT-SB com a GE para espécie *P. falciparum* (0,67%), porém considerada boa. Para *P. vivax* a concordância foi ótima (0,81%). O erro padrão para *P. falciparum* foi 0,092 e para *P. vivax* 0,025.

A sensibilidade e especificidade do RDT-SB comparando com os resultados obtidos na GE para *P. falciparum* foram respectivamente de 63,10% e 99,30%, e para *P. vivax* 82,19% e 96,78%.

O RDT-SB apresentou Valores Preditivo Positivo (VPP) e negativo (VPN) respectivamente de 75,00% e 98,78% para *P. falciparum*, e de 93,75% e 90,25% para espécie *P. vivax*.

As concordâncias observada e esperada entre o RDT-SB e a GE para espécie *P. falciparum* foram respectivamente 98,14% e 94,26%, e para *P. vivax* 91,39% e 54,57%. Para essa análise, foram incluídos os resultados verdadeiros positivos e negativos pelo RDT-SB. Dessa maneira, como o número de RDT-SB que apresentaram resultados verdadeiros negativos foram significantes, houve elevada concordância entre os métodos.

4.7 ANÁLISE DE PARÂMETROS E DESEMPENHO DO RDT-SB COMPARADO À PCR

Analizando o desempenho do RDT-SB comparando com a técnica da PCR, a concordância entre os métodos de acordo com o índice Kappa foi menor para espécie *P. falciparum* 0,67% do que para a espécie *P. vivax* 0,78%, porém de acordo com a escala de concordância do Kappa (tabela 2), foi considerada boa para ambas as espécies de *Plasmodium*.

A sensibilidade e especificidade observada pelo RDT-SB em relação à PCR foram respectivamente para *P. falciparum* 63,16% e 99,30% e para *P. vivax* 78,45% e 97,49%.

O VPP e VPN para *P. falciparum* foi respectivamente de 75,00% e 98,78%, e para *P. vivax* de 95,29% e 87,50%.

A relação de concordância observada e esperada entre o RDT-SB e a PCR foram respectivamente 98,14% e 94,25% para *P. falciparum*, e para *P. vivax* 90,02% e 53,80%. A tabela 8 demonstra o desempenho do RDT-SB comparada a técnica PCR.

Tabela 8: Estimativa de parâmetros e desempenho do RDT-SB comparado com a PCR.

<i>P. falciparum</i>					<i>P. vivax</i>			
SD	PCR			TOTAL	SD	PCR		
	+	-			+	-		TOTAL
Pf+ P.f/Pan	12	4		16	Pan	182	9	191
Pan+ neg	7	568		575	Pf+ P.f/Pan+ neg	50	350	400
TOTAL	19	572		591	TOTAL	232	359	591
Índice KAPPA (%; IC95%)	0,67 (0,49-0,85)				0,78 (0,73-0,83)			
Erro Padrão	0,092				0,026			
Proporção de concordância (%;IC95%)	98,10 (0,96-0,99)				90,00 (0,87-0,92)			
Sensibilidade (%;IC95%)	63,16 (38,38-83,65)				78,45 (72,59-83,56)			
Especificidade (%;IC95%)	99,30 (98,22-99,80)				97,49 (95,29-98,34)			
Razão de probabilidade positiva	90,32 (32,08-254,30)				31,29 (16,36-59,86)			
Razão de probabilidade negativa	0,37 (0,21-0,67)				0,22 (0,17-0,28)			
Prevalência da doença (%;IC95%)	3,21 (1,95-4,98)				39,26 (35,30-43,32)			
Valor preditivo positivo (%;IC95%)	75,00 (47,63-92,58)				95,29 (91,24-97,82)			
Valor preditivo negativo (%;IC95%)	98,78 (97,51-99,51)				87,50 (83,85-90,58)			
Numero de concordâncias observadas	580 (98,14%)				532 (90,02%)			
Numero de concordâncias esperadas	557 (94,25%)				318 (53,80%)			

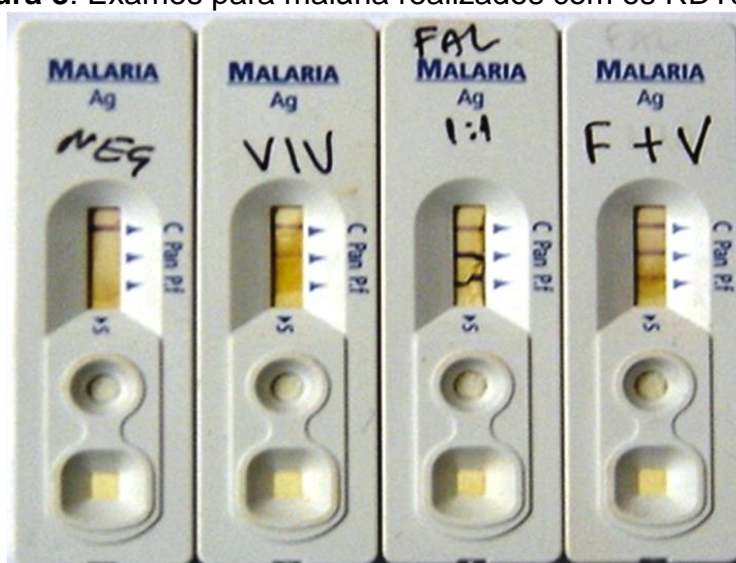
SD = Teste rápido SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan POCT; neg = Negativo; Pan = Casos de infecção por *P. vivax*; P.f = Casos de infecção por *P. falciparum*; P.f/Pan = Casos de infecção por *P. falciparum* + *P. vivax*.

A figura 8 demonstra alguns exames de RDT-SB que foram realizados no presente estudo. O primeiro RDT-SB à esquerda, aponta apenas a linha controle, indicando se tratar de um teste com resultado negativo. O segundo RDT-SB da esquerda para direita, apresenta duas linhas visíveis, a linha controle e a linha teste Pan, que indica detecção da proteína pLDH marcador das espécies de malária humana não-*falciparum*.

Após o exame pela PCR foi confirmada a presença do *P. vivax*. No terceiro e quarto RDT-SB da esquerda para direita, foi observado a presença de três linhas: a linha controle, a linha teste Pan e a linha teste P.f. De acordo com o fabricante,

quando surgem as linhas testes Pan e P.f simultaneamente, tanto pode se tratar de infecção por *P. falciparum* apenas, como também pode ser infecção mista. Nesse caso, utilizou-se a correção pela técnica da PCR por ser um método sabidamente sensível e específico. Dessa maneira, observou-se que o terceiro teste da esquerda para direita se tratava de infecção por *P. falciparum* apenas, já o quarto teste da esquerda para direita foi confirmado pela PCR a presença de infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*).

Figura 8: Exames para malária realizados com os RDTs-SB.



Nota: C = Linha controle; Pan = Linha teste anti-pLDH; P.f = Linha teste anti-hrp-2 (*P. falciparum*); Neg = Negativo; Viv = RDT positivo para *P. vivax*; Fal = RDT positivo para *P. falciparum*; F+V = RDT positivo para *P. falciparum* + *P. vivax*. Fonte da imagem: o Autor.

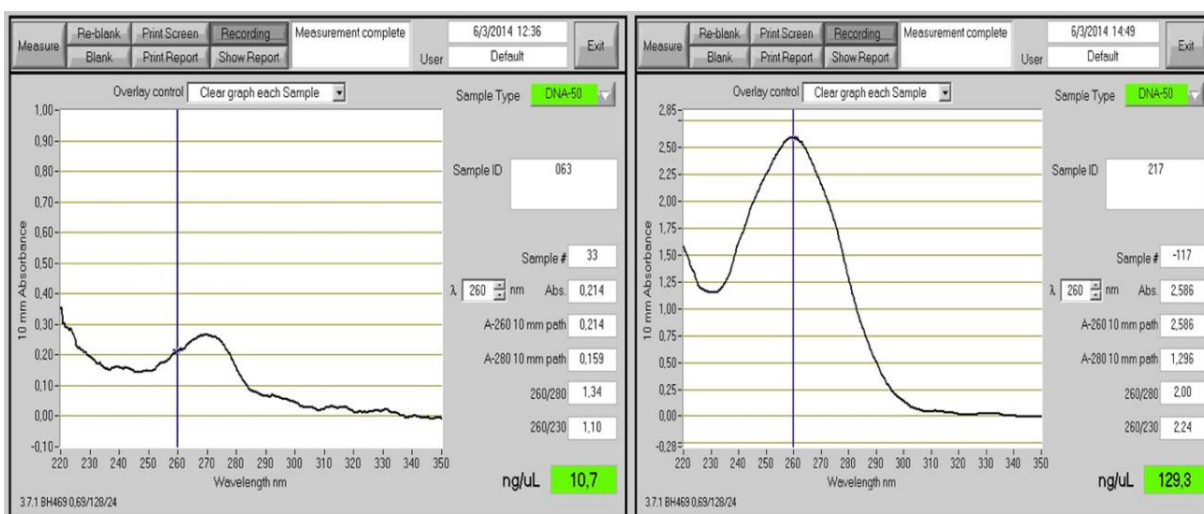
4.8 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DO gDNA PLASMODIAL POR ESPECTOFOTOMETRIA

Antes da etapa de análise das amostras pela técnica de PCR, todas as amostras obtidas no presente estudo foram submetidas a quantificação do gDNA utilizando um espectrofotômetro de absorvância para que fosse verificada a quantidade e qualidade de gDNA plasmodial em ng/μL.

A figura 9 demonstra a curva de absorvância de duas amostras com padrões de quantidade e qualidade distintas, identificadas como 63 e 217, que foram extraídas pelo método Fenol-Clorofórmio.

A amostra 63 apresentou 10,7 ng/μL de gDNA com curva de absorvância de 1,34nm na razão de 260/280, sendo que uma amostra com boa qualidade deve apresentar um perfil de curva entre 1,7 a 2,0 nm. Em contrapartida, a amostra 217 apresentou 129,3 ng/μL de gDNA com excelente curva de absorvância, atingindo o pico de 2nm na razão de absorvância 260/280.

Figura 9. Imagem da curva de absorvância de amostras quantificadas em espectrofotômetro.

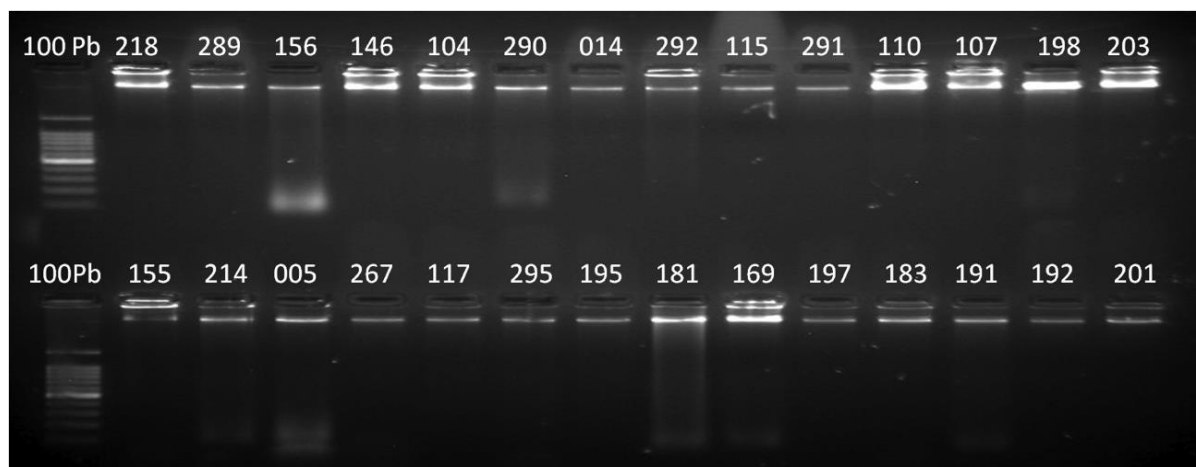


Nota: As amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro “Nanodrop 1000 Thermo scientific Uniscience”. Sample ID = identificação da amostra; Abs = Absorvância; λ = Comprimento de onda; A-260 = Absorvância de 260nm; A-280 = Absorvância de 280nm; 260/280 = Razão de Absorvância entre 260nm e 280nm; 260/230 = Razão de Absorvância entre 260nm e 230nm; ng/uL = Quantidade de DNA genômico em 1uL de amostra. Fonte da imagem: o Autor.

4.9 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIDADE DO gDNA PLASMODIAL EM GEL DE AGAROSE A 0,8%

Para verificar a qualidade das amostras extraídas, totalizando 644, todas foram submetidas a aplicação em gel de agarose a 0,8%. Algumas amostras apresentaram melhor qualidade, como por exemplo, as amostras 218, 146, 110, 107, 198, 203, 181 e 169. Outras demonstraram pouca quantidade de gDNA, por exemplo, 155, 192, 295 dentre outras que apresentaram bandas fracas ou degradadas, como observado na figura 10.

Figura 10. Avaliação da qualidade e quantidade do gDNA plasmodial extraído pelo método Fenol-Clorofórmio.



Nota: 100pb = Marcador de 100 pares de base. As demais canaletas (superior e inferior) demonstram algumas amostras que foram submetidas a aplicação em gel de agarose a 0,8% para verificar a qualidade do gDNA.

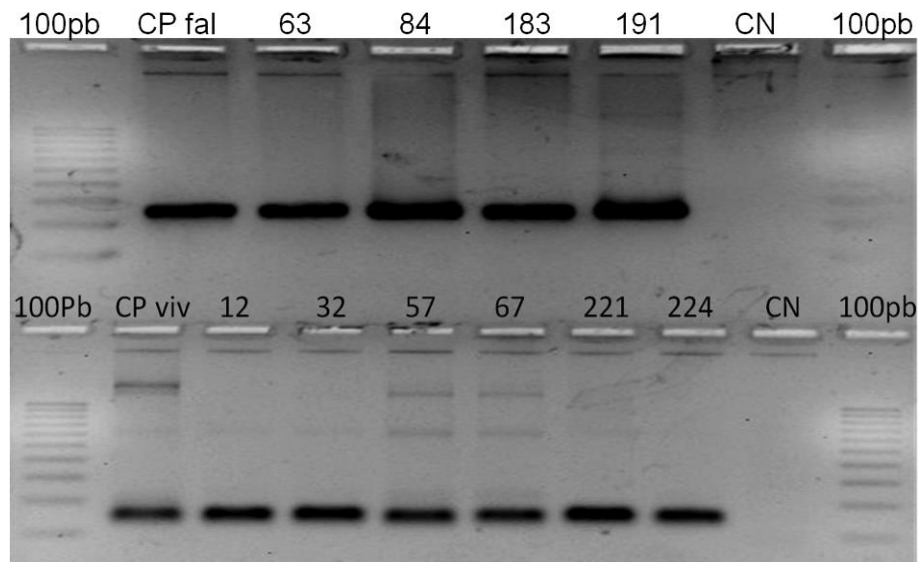
4.10 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR

Como descrito no item 3.9, após a etapa de extração e quantificação de DNA as amostras foram submetidas ao método de PCR. A figura 11 apresenta algumas amostras que amplificaram, como por exemplo, as amostras 63, 84, 183 e 191 as quais foram positivas para espécie *P. falciparum* com fragmentos na região de 205pb, já as amostras 12, 32, 57, 67, 221 e 224 apresentaram positividade para *P. vivax* com fragmentos na região de 120pb.

4.11 SENSIBILIDADE DA PCR

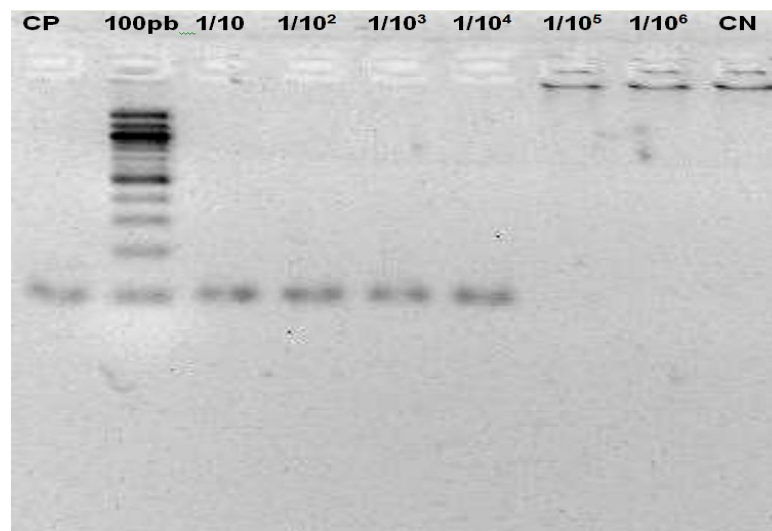
Na figura 12 é demonstrada a sensibilidade da PCR numa amostra com parasitemia inicial 1.802 parasitos/ μ L. A amostra foi submetida a diluições seriadas e como observada, o nível de detecção da PCR se deu até a amostra diluída na razão $1/10^4$, ou seja, o limiar de detecção da PCR foi $1802/10.000 = 0,18$ parasitos/ μ L, demonstrando que a técnica apresentou boa sensibilidade.

Figura 11. Amostras de participantes que apresentaram positividade na PCR para as espécies *P. vivax* e *P. falciparum*.



Nota: Gel de agarose (LE- Bio América) 1,5% corado com gel RED (marca); 100 pb = Marcador de peso molecular de 100 pb (primeira e última canaleta superior e inferior); CP fal = Controle positivo *P. falciparum* com fragmento de 205 pb (segunda canaleta superior); 63, 84, 183 e 191 (canaleta superior) = amostras de pacientes do presente estudo positivas para *P. falciparum*; CN = Controle negativo (da esquerda para direita, penúltimas canaletas superior e inferior); CP viv = Controle positivo de *P. vivax* com fragmento de 120 pb (segunda canaleta inferior); 12, 32, 57, 67, 221 e 224 (canaleta inferior) = amostras de pacientes do presente estudo positivas para *P. vivax*.

Figura 12: Imagem de gel com amostra positiva para *P. vivax* submetidas a diluições seriadas para análise da sensibilidade da PCR.



Nota: CP = Controle positivo para *P. vivax* (120 pb) de paciente com parasitemia de 1802 parasitos/ μ L; 100pb = Marcador de peso molecular de 100 pb; 1/10, 1/10², 1/10³, 1/10⁴, 1/10⁵ e 1/10⁶

= Diluições seriadas realizadas da amostra positiva utilizada como controle positivo; CN = Controle negativo.

4.12 ANÁLISE DE PARÂMETROS E DESEMPENHO DA MICROSCOPIA (GE) COMPARADO A PCR

Além das análises de comparação dos resultados do RDT-SB com a GE e a PCR, outra avaliação realizada foi a análise de concordância entre a GE e a PCR (Tabela 9). De acordo com a escala apresentada na tabela 6, a concordância foi perfeita para *P. falciparum* (1,00%) e ótima para *P. vivax* (0,96%). A sensibilidade e especificidade da GE comparada ao método molecular para *P. falciparum* foi de 100,00% e para *P. vivax* 95,88% e 100,00%. O VPP foi de 100% para ambas espécies, e VPN de 100,00% para *P. falciparum* e 97,57% para *P. vivax*.

O número de concordância observada para *P. falciparum* foi 100,00% e 98,45% para *P. vivax*. A concordância esperada entre a GE e a PCR para *P. falciparum* e *P. vivax* respectivamente foram 93,98% e 53,41%.

Tabela 9: Estimativa de parâmetros e desempenho da microscopia (GE) comparado com a PCR.

	<i>P. falciparum</i>				<i>P. vivax</i>			
	Microscopia	PCR		TOTAL	Microscopia	PCR		TOTAL
		+	-			+	-	
Positivo		20	0	20	Positivo	233	0	233
Negativo		0	624	624	Negativo	10	401	411
TOTAL		20	624	644	TOTAL	243	401	644
Índice KAPPA (%; IC95%)		1,00 (1,00-1,00)				0,96 (0,94-0,98)		
Erro Padrão		0				0,01		
Proporção de concordância (%;IC95%)		100,00 (0,99-1,00)				98,50 (0,97-0,99)		
Sensibilidade (%;IC95%)		100,00 (83,01-100,00)				95,88 (92,56- 98,01)		
Especificidade (%;IC95%)		100,00 (99,40-100,00)				100,00 (99,70-100,00)		
Razão de probabilidade positiva		-				-		
Razão de probabilidade negativa		-				0,04 (0,02- 0,08)		
Prevalência da doença (%;IC95%)		3,11 (1,91-4,76)				37,73 (33,98- 41,60)		
Valor preditivo positivo (%;IC95%)		100,00 (83,01-100,00)				100,00 (98,41-100,00)		
Valor preditivo negativo (%;IC95%)		100,00 (99,40-100,00)				97,57 (95,57- 98,83)		
Numero de concordâncias observadas		644 (100,00%)				634 (98,45%)		
Numero de concordâncias esperadas		605 (93,98%)				344 (53,41%)		

4.13 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE O RDT-SB E A MICROSCOPIA (GE) POR NÍVEL DE PARASITEMIA

Níveis baixos de parasitemia podem diminuir a sensibilidade dos RDTs. Diante disso, outra análise realizada no presente estudo, foi a verificação da concordância do RDT-SB com a GE de acordo com o nível de parasitemia do paciente, como apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Análise de Concordância entre os resultados do RDT-SB e a microscopia (GE) de acordo com o nível de parasitemia.

Parasitos/ μ L	Resultado geral		Pan	P.f
	Verdadeiros positivos	Falsos negativos	N	N
<100 (%)	33 (45,8)	39 (54,2)	29 (87,9)	4 (12,1)
101 - 500 (%)	79 (98,8)	1 (0,2)	67 (84,8)	12 (15,2)
501 - 1000 (%)	41 (100,0)	-	41 (100,0)	-
>1000 (%)	51 (89,5)	6 (10,5)	51 (100,0)	-

Nota: Pan = Resultado do RDT-SB positivo para as espécies de *P. não-falciparum*; P.f = Resultado do RDT-SB positivo para *P. falciparum*; N = Número de RDT-SB com resultado verdadeiros positivos; <100 = níveis de parasitemia inferior a 100 parasitos/ μ L; >1000 = níveis de parasitemia superior a 1000 parasitos/ μ L.

Foi observado que o RDT-SB em níveis de parasitemia até 100 parasitos/ μ L, apresentou um número maior de resultados falso negativos 39 exames, correspondente a 54,2% dos testes nessa faixa de parasitemia. Já o número de RDT-SB com resultado verdadeiros positivos foram 33, correspondente a 45,8% do total. Dentre esses, 29 foram para espécie de *Plasmodium não-falciparum* e 4 para espécie *P. falciparum*.

Em níveis de parasitemia entre 100 a 500 parasitos/ μ L, apenas 1 (0,2%) RDT-SB apresentou discordância com a GE e 79 (98,8%) RDT-SB apresentaram resultados verdadeiros positivos, sendo 67 para espécie de *Plasmodium não-falciparum* e 12 para *P. falciparum*. Nas parasitemias em níveis de 500 a 1000 parasitos/ μ L não houve discordância entre os resultados do RDT-SB e a microscopia. Dos 41 resultados verdadeiros positivos, todos foram positivos para as espécies de *Plasmodium não-falciparum*. E, na faixa de parasitemia acima de 1000

parasitas/ μ L, 51 (89,5%) foram verdadeiros positivos, todos para espécie de *Plasmodium* não- falciparum e 6 (10,5%) apresentaram resultados falso negativos.

5. DISCUSSÃO

A maior notificação de casos de malária no Brasil é registrada na Amazônia Legal, com mais de 99% dos casos registrados. Em muitas áreas dessa região não há condições de realizar o exame padrão da malária (gota espessa), seja por falta de infraestrutura, seja pelo difícil acesso, ou ainda pela falta de profissionais qualificados para realizar o diagnóstico. Diante disso, surge a necessidade de um método de diagnóstico alternativo para malária (PALMER et al., 1998; NEVES, 2005; GOMES et al., 2013).

O método de diagnóstico recomendado pelo Ministério da Saúde é o método da gota espessa, considerado o padrão ouro para o diagnóstico da malária por ser um método barato e apresentar bom custo benefício (BRASIL, 2009). Entretanto, essa técnica depende de fatores importantes como a qualificação do profissional microscopista, boa qualidade dos equipamento e insumos, além dos cuidados nas técnicas recomendadas no preparo das lâminas (DURRHEIN et al.,1997; ÁVILA e FERREIRA, 2000; KILLIAN et al., 2000).

Muitos estudos apontam que os RDTs têm se mostrado uma ferramenta importante para realização do diagnóstico precoce da malária, que na maioria dos casos propicia o tratamento rápido em áreas endêmicas de difícil acesso. Por esse aspecto, o uso desses RDTs é recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da malária nessas regiões. Contudo, muitas vezes o baixo desempenho dos RDTs é um ponto negativo que deve ser considerado, além do aspecto comercial dos fabricantes que podem retirá-los do mercado rapidamente sem aviso prévio, o que pode acarretar a descontinuidade dos programas de controle da doença em áreas com essas características.

Conforme recomendações da World Health Organization (WHO) para que os RDTs sejam validados, os mesmos devem apresentar resultados tão precisos quanto os resultados obtidos pelo método da GE realizada por um técnico em condições de campo, apresentar sensibilidade superior a 95% quando comparado com a microscopia, e nos casos em que o nível de parasitemia for superior 100 parasitos/ μ L, os RDTs devem apresentar sensibilidade de 100% (WHO, 2000).

No presente estudo os resultados observados mostraram que a sensibilidade e especificidade do RDT-SB, quando comparado com o resultado da GE, foram respectivamente de 82,19% e 96,78% para *P. vivax*, e para *P. falciparum* foi de 63,10% e 99,30%. A sensibilidade global foi de 72,60%. Em relação a PCR a sensibilidade e especificidade do RDT-SB foram respectivamente de 78,45% e 97,49% para *P. vivax*, e para *P. falciparum* foi de 63,16% e 99,30%.

Os resultados revelaram quatro casos de exames falso-positivos para *P. vivax* pelo RDT-SB em relação a GE e PCR, sobre esse fato há relatos de associação de indivíduos com fator reumatóide positivo e falso positividade para malária. Lee et al., (2012) observou taxas de falso positivos por RDT variando entre 2,2% a 13,0% em paciente fator reumatóide positivo.

O RDT-SB apresentou 49 exames falsos negativos os quais foram confirmada a presença do *P. vivax* pela PCR, e dois de *P. falciparum*.

A PCR vem se mostrando uma ferramenta importante no diagnóstico da malária por apresentar sensibilidade e especificidade superiores. Vários estudos apontam elevada sensibilidade da PCR mesmo em parasitemias muito baixas (SNOUNOU et al., 1993 b; HUMAR et al., 1997), assim como em casos suspeitos da doença quando os diagnósticos de rotina não apresentam resultados positivos (KIMURA et al., 1997; HANSCHIED, 1999; HANSCHIED; VALADAS e GROBUSH, 2002; ALI et al., 2005). Contudo, sabemos que as técnicas moleculares não são acessíveis para a rotina de diagnóstico da malária.

O fato dos RDTs não apresentar sensibilidade satisfatória principalmente em parasitemias baixas faz aumentar a importância de um controle de qualidade. Alguns estudos baseados na detecção do DNA do parasito retirado da membrana de nitrocelulose de RDTs testados demonstraram bons resultados pela PCR, apresentando resultados positivos em RDTs com resultados falsos negativos (VERON et al., 2006; CNOPS et al., 2011; ISHENGOMA et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstrou que o RDT-SB apresentou desempenho abaixo dos relatados pelo fabricante Standard Diagnostics, Inc Korea. De acordo com esse, a menor sensibilidade global encontrada foi de 95,0% quando comparada com a microscopia, e 93,8% na menor parasitemia

observada (50 parasitos/ μ L). É importante destacar que os kits de RDTs comerciais disponíveis são manufaturados com cepas e antígenos obtidos na África e Sudeste Asiático, cuja as condições ambientais são diferentes de outros países, podendo acarretar resultados muito diversificados em outras regiões endêmicas situadas em outros continentes. Alguns estudos, citados adiante, descrevem bons resultados com sensibilidade dentro do recomendado pela OMS. Todavia, é importante ressaltar que os mesmos realizaram seus estudos em países diferentes e que apresentam características distintas à Região amazônica.

Alguns autores citados adiante observaram bom desempenho na acurácia dos RDTs comparando com outros métodos. Em estudo realizado em região de fronteira na Índia, foi analisado o desempenho do RDT Parascree® Pan/Pf que utiliza as mesmas proteínas alvo do RDT-SB (HRP-2 e pLDH). O trabalho contou com um total de 327 amostras e a sensibilidade e especificidade do RDT Parascree® Pan/Pf em relação a GE para *P. falciparum* foram respectivamente de 96,0% e 98,2%, e para *P. vivax* de 90,7% e 98,9%. Quando comparada a PCR foi de 95,4% e 98,8% para *P. falciparum*, e 89,0% e 98,8% para *P. vivax* (ELAHI et al., 2013).

Pesquisa realizada na Coreia Kim et al., (2008) testaram a sensibilidade dos RDTs SD Malaria Antigen Pv (SD diagnóstico, Kyonggi, ROK) específico para *P. vivax* e RDT SD Malaria Antigen P.f específico para *P. falciparum* e comparou com o RDT OptiMAL-IT® (Diamed, Cressier, na Suíça). O estudo contou com 137 voluntários e foi observada sensibilidade satisfatória nos testes SD Malaria em relação a GE para *P. falciparum* e *P. vivax* respectivamente 97,6% e 93,4% e em comparação com o RDT OptiMAL-IT® 97,6% e 94,9%. Em contrapartida, os autores verificaram a diminuição da sensibilidade dos RDTs para parasitemias abaixo de 100 parasitos/ μ L, conforme observado no presente estudo.

No Senegal pesquisa realizada com 273 pacientes, foi avaliado o desempenho do RDT “Malaria Antigen P.f®” que utiliza a proteína HRP-2 como marcador da espécie *P. falciparum*, a mesma utilizada no RDT-SB. Este apresentou sensibilidade para GE e PCR respectivamente de 98,2% e 97,1% (FAYE et al., 2013).

Bayisa et al., (2015) avaliou o desempenho do RDT SD Malaria em região da Etiópia. Do total de amostras, 107 apresentaram positividade para malária na GE. A sensibilidade e especificidade do RDT SD Malaria foram respectivamente 90,7% e 96,0%, demonstrando um padrão de sensibilidade satisfatório.

Mendoza et al., (2013) avaliou a performance diagnóstica do RDT SD Bioline Malaria Pf/Pan em relação à GE corrigida pela PCR. O estudo foi conduzido na Colômbia e foram testadas 383 amostras. O RDT apresentou sensibilidade e especificidade para espécie *P. vivax* e *P. falciparum* respectivamente 92,0%; 98,7% e 88,1%; 97,9%.

Trouvay et al., (2013) realizou trabalho na Guiana francesa para verificar o desempenho do RDT SD Bioline Malaria Pf/Pan em relação a GE, assim como foi investigado casos de deficiência do gene que produz a HRP-2 do *P. falciparum* na população estudada. Nesse estudo foram analisados 960 casos suspeitos de malária e a sensibilidade do RDT SD Bioline Malaria Pf/Pan foi de 96,8% para *P. falciparum* e 86,0% para *P. vivax*. Em nenhum isolado analisado foi observada deficiência no gene responsável pela produção da HRP-2 na população de estudo.

De maneira geral, o presente estudo demonstrou que o RDT-SB apresentou sensibilidade inferior aos observados pelos autores citados anteriormente. Quando somente a especificidade foi avaliada, a discordância observada foi discreta, corroborando com outros estudos.

Alguns autores têm sugerido que alguns fatores como: (i) A qualidade dos Kits, (ii) a temperatura em que os RDTs são armazenados, (iii) a dificuldade da ligação do anticorpo monoclonal ao antígeno nos casos de parasitemias muito baixas principalmente em portadores assintomáticos da doença, podem interferir negativamente na taxa de co-positividade do RDT com outro método (MASON et al., 2002; KOLACZINSKI et al., 2004).

Outra característica dos RDTs a ser destacada é a escolha da proteína que é utilizada como alvo antigênico. Sobre a proteína HRP-2, alguns autores descrevem que reações cruzadas podem ocorrer entre a proteína HRP-2 do *P. falciparum* e anticorpos monoclonais ou com epítomos dessa proteína que são hexapeptídeos

extremamente polimórficos e que podem prejudicar o desempenho dos RDTs que utilizam a HRP-2 (BAKER et al., 2005; LEE et al., 2006; LEE et al., 2012).

A diversidade genética do gene HRP-2, assim como casos de população com deleção desse gene, apresenta-se também como fatores que podem comprometer a sensibilidade dos RDTs que utilizam essa proteína como alvo antigênico (BAKER et al., 2005; GAMBOA et al., 2010).

Em trabalho realizado em Mali por Koita et al., (2012) sobre casos de deleção na região do gene da HRP-2, foi observado que 45,0% dos resultados falso negativos pelo RDT ParaSight® tratava-se de pacientes com deleção do gene dessa proteína.

Ainda sobre a proteína alvo do *P. falciparum* (HRP-2), tem sido descrito que sua permanência por tempo prolongado no soro de paciente já tratado da doença, eleva a quantidade de resultados falso positivos pelo teste, e isso pode levar a utilização de terapêutica inadequada (IQBAL et. al., 2004, FOGG et. al., 2008; HAWKES et al., 2014).

Em estudo de metanálise com vários RDTs de diferentes fabricantes foi observada elevada concordância com a GE entre os RDTs que utilizam a HRP-2 como alvo antigênico (MARX et al., 2005).

Outra proteína utilizada, a pLDH, também tem sido discutida. De acordo com Hawkes et al., (2014) nos casos de baixa parasitemia a detecção da pLDH fica comprometida, principalmente em populações que tiveram vários episódios de malária, como nos casos dos portadores assintomáticos.

Níveis baixos de parasitemia pode diminuir consideravelmente a sensibilidade dos RDTs. No presente estudo foram observados 39 RDTs com resultados falso negativos para *P. vivax* e 2 para *P. falciparum* em relação à GE. Dos 39 RDTs que apresentaram falso negatividade para *P. vivax*, 37 amostras foram diagnosticadas com parasitemia inferior a 100 parasitos/ μ L, assim como nos 2 casos falso negativos para *P. falciparum*. Um dado importante a ser destacado é que o maior número de RDTs com resultados falso negativos ocorreu em níveis de parasitemia abaixo de 100 parasitos/ μ L (54,5%) corroborando com o que foi observado por Kim et al., (2008). Dessa maneira, o presente estudo demonstrou que RDT-SB apresentou sensibilidade insatisfatória nos casos de baixas parasitemias, corroborando com

outros autores que descrevem que a parasitemia pode ser fator determinante na performance dos RDTs (MOODY et al., 2002; MURRAY et al., 2008).

Os RDTs que são armazenados em condições e temperaturas ideais e quando os níveis de parasitemia são superiores a 100 e 500 parasitos/ μ L respectivamente para espécie *P. falciparum* e *P. vivax*, podem apresentar sensibilidade e especificidade superiores a 95% (WONGSRICHANALAI et al., 2007).

Sobre a capacidade dos RDTs reproduzirem resultados satisfatórios em condições de armazenamento e temperaturas diferentes. Penhalbel et al., (2005) avaliou a performance do RDT OptiMAL-IT em condições de estocagem diferentes aplicadas em áreas endêmicas para malária no Brasil. Os Kits foram armazenados a três temperaturas diferentes (25°C, 30°C e 39°C) por 24, 48 e 72 horas antes da utilização dos RDTs. O presente estudo apresentou 111 amostras positivas pela GE, e o RDT OptiMAL-IT detectou a presença do parasito nas diferentes temperaturas e períodos, exceto em duas amostras positivas para *P. malariae*, demonstrando que a variação no tipo de estocagem e temperatura não influenciou no resultado do RDT analisado.

Em outro trabalho Gomes et al., (2013) investigaram a característica do desempenho de dois RDTs “OptiMAL- IT Pf/Pan (DiaMed, Cressier, Suíça)” e “ICT-Now Pf/Pan (Binax, Inc., Scarborough, Maine, EUA)”, de maneira que os RDTs foram armazenados por 15 meses em temperatura ambiente em 5 centros de diagnósticos de malária nos municípios de Colniza (MT), Porto Velho (RO), Manaus (AM), Macapá (AP) e Tucuruí (PA), na Amazônia Brasileira. Os autores avaliaram 1.627 amostras para o RDT OptiMAL-IT Pf/Pan com sensibilidade de 79,7% para *P.falciparum* e 85,7% para espécie de *Plasmodium* não-*falciparum*. Foram analisadas 1.602 amostras pelo RDT ICT-Now Pf/Pan, a sensibilidade encontrada foi de 87,9% para *P.falciparum* e 72,5% para espécie de *Plasmodium* não-*falciparum*. Foi observado que os RDT-SB apresentaram sensibilidade diminuída comparado a outros trabalhos que utilizaram os mesmos RDTs, porém realizados em outros países. Dessa maneira, sugere-se que as características peculiares da Amazônia brasileira que apresenta em grande parte do ano temperaturas elevadas, podem prejudicar o desempenho dos RDTs, pelo fato principalmente desses possuírem

anticorpos aderidos à uma membrana de nitrocelulose e esses sofrerem desnaturação, apresentando influência negativa na sensibilidade dos RDTs.

Os RDTs quando armazenados em temperaturas acima dos recomendados pelos fabricantes dos Kits podem ter sua sensibilidade diminuída, prejudicando a detecção dos antígenos de malária pelos RDTs. Também já foi observado que temperaturas elevadas podem diminuir a intensidade da coloração das tiras cromatográficas dos RDTs, prejudicando a visualização das mesmas (JORGENSEN et al., 2006; CHIODINI et al., 2007).

Apesar dos resultados observados na presente investigação apresentarem padrões de sensibilidade diferentes aos observados em outros países como África e Ásia, e pelo fato de serem escassos os trabalhos que avaliam o desempenho dos RDTs para malária no Brasil, em especial na Amazônia Brasileira, buscou-se realizar análise comparativa com outros estudos realizados nessa região. Diante disso, foi realizada uma análise das concordâncias dos resultados do RDT-SB desse trabalho, com dois outros trabalhos que utilizaram amostras provenientes de população de áreas endêmicas da Amazônia Brasileira. O primeiro, realizado por Lima (2011), onde se testavam vários métodos de diagnóstico para malária, inclusive o RDT-SB. O teste apresentou sensibilidade global em relação à GE e Nested PCR respectivamente de 73,3% e 77,9% (no presente estudo foi 72,6% e 70,7%), demonstrando perfil de concordância mais próxima que quando comparada a regiões de outros países.

O segundo trabalho, esse conduzido por Gomes et al., (2013) e como descrito anteriormente, onde era avaliada a performance de dois RDTs “OptiMAL-IT e ICT-Now” quando armazenados em condições de campo na Amazônia Legal. Os autores descrevem para o OptiMAL-IT sensibilidade para *P. falciparum* e *P. não-falciparum* respectivamente de 79,7% e 85,7%, e para o teste ICT-Now 87,9% e 72,5%.

O desempenho dos RDTs OptiMAL-IT e ICT-Now para *P. falciparum* foi superior ao observado no presente estudo, já para espécie *P. vivax* o desempenho do RDT-SB foi superior ao ICT-Now e pouco discordante para o RDT Optimal- IT.

Contudo, o que se pôde observar com os resultados do RDT-SB, foi um perfil de concordância mais próxima quando comparado a outros trabalhos realizados na

Amazônia Brasileira ou com amostras provenientes dessa região, com sensibilidade abaixo de 90,0%.

Dessa maneira, o presente estudo mostrou que o RDT-SB apresentou sensibilidade insatisfatória, abaixo das recomendações da OMS. Quanto à especificidade, os resultados foram satisfatórios e corroborou com trabalhos de outros autores (MENDOZA et al., 2013; TROUVAY et al., 2013).

A proteína pLDH mostrou-se mais sensível que a HRP-2, e a especificidade apresentada para ambas as proteínas foi satisfatória. Quanto à proteína HRP-2, essa apresentou padrão de sensibilidade diferente da observada por (MARX et al., 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que em locais onde não tenha serviço de diagnóstico por microscopia, o uso do RDT-SB pode ser importante para eliminar tratamento inadequado nos casos de pacientes febris por causas diferentes à malária, pois o teste apresentou bom desempenho no diagnóstico de pessoas com suspeita, mas livre do parasita, já que apresentou especificidade dentro das recomendações da OMS. Em contrapartida, nos casos de pacientes positivos para malária, o RDT-SB pode não apresentar resultado confiável principalmente em níveis de parasitemia abaixo de 100 parasitos/ μ L, como mostram os resultados da baixa sensibilidade apresentada pelo RDT-SB nesse estudo. Esses dados corroboram com o que foi descrito por Rodolfo et al., (2007) que em seu estudo observou falhas de detecção pelos RDT-SB nos padrões de infecções mistas e baixas parasitemias.

Outro fator importante a ser destacado diz respeito ao elevado número de RDT-SB que apresentaram resultados inválidos 56 (8,64%), apontando falha mesmo quando foi seguida a recomendação do fabricante. Esses dados somados a dificuldade de interpretação do RDT-SB, baixa sensibilidade do RDT-SB 63,1% para *P. falciparum* e 82,1% para *P. vivax*, além do fato de apresentar custo superior ao método da GE, revelou em parte, que o RDT-SB apresentou um padrão negativo em relação ao custo-benefício do teste.

O baixo desempenho do RDT-SB no presente estudo pode ter como causa a característica da área de estudo, temperaturas de armazenamento, inespecificidade

na ligação do anticorpo com a enzima alvo do parasito, defeito no lote, mas principalmente pelos casos de baixas parasitemias observados nas amostras utilizadas no estudo. Entretanto, a baixa sensibilidade foi o fator que mais se destacou.

Dessa maneira, torna-se imperioso que os RDTs adotados para o diagnóstico da malária em território brasileiro sejam submetidos à avaliação de desempenho por meio de análise da sensibilidade e especificidade, além de realizar periodicamente avaliação do treinamento dos profissionais que executam o teste em campo, com intuito de subsidiar os órgãos de vigilância em saúde no controle da doença, além de agregar uma ferramenta de qualidade para a eliminação e vigilância da malária no Brasil.

6. CONCLUSÃO

O RDT-SB apresentou sensibilidade insatisfatória em relação à GE, 63,1% para *P. falciparum* e 82,1% para *P. vivax*, estando abaixo da recomendada pelo Ministério da Saúde.

A sensibilidade global do RDT-SB observada no presente estudo (72,6%) foi abaixo da anunciada pelo fabricante (95,0%).

A especificidade apresentada pelo RDT-SB foi satisfatória, 99,3% para *P. falciparum* e 96,7% para *P. vivax*.

Em relação à GE e PCR, o RDT-SB apresentou melhor sensibilidade para a proteína pLDH marcador da infecção por *Plasmodium* não-falciparum (82,1% e 78,4%).

Em relação à GE e PCR, o RDT-SB apresentou menor sensibilidade (63,1%) para a proteína HRP-2 do *P. falciparum*.

O RDT-SB apresentou nível de discordância mais acentuado nas parasitemias abaixo de 100 parasitos/ μ L (54,2%).

A baixa sensibilidade do RDT-SB, a dificuldade de interpretação dos resultados, somados ao elevado número de RDTs com resultados inválidos observados no presente estudo, demonstrou um padrão negativo em relação ao custo-benefício do referido teste.

Para auxiliar os programas de vigilância da malária no Brasil, é importante que os RDTs adotados para o diagnóstico da malária em território nacional sejam, primeiramente, submetidos a uma avaliação multicêntrica em áreas endêmicas, de forma a avaliar sua sensibilidade e especificidade, além do treinamento dos profissionais que executarão o teste em campo. Esses cuidados iniciais podem contribuir para redução dos custos com os programas de controle da malária.

7. RECOMENDAÇÕES

Em relação ao RDT-SB avaliado, recomendamos a realização de novos estudos em outras áreas da Amazônia Legal antes da sua introdução na rotina do diagnóstico da malária.

Em áreas endêmicas em fase de controle e eliminação da malária, não se recomenda o uso do RDT-SB devido ao baixo desempenho do teste observado no presente estudo.

Nos casos febris com suspeita de malária em que o primeiro RDT-SB fornecer resultado negativo, recomendamos a realização de novo exame RDT-SB após 24 a 48 horas, devido à baixa sensibilidade do RDT-SB, principalmente em parasitemias inferiores a 100 parasitos/ μ L.

Sobre o RDT-SB avaliado foi observada falha no processo de industrialização, haja vista que 2 kits individuais de RDT-SB foram descartados por estarem incompletos (frasco do diluente lacrado e vazio). Dos RDTs testados 56 (9,0%) apresentaram resultados inválidos, ou seja, mesmo quando seguida a recomendação do fabricante estes não apresentaram a linha controle nem as linhas testes dentro do tempo estipulado de 15 minutos. Isso demonstra falha na produção e controle de qualidade, com prejuízos na análise do custo-benefício do referido teste.

Além disso, áreas endêmicas onde haja a presença de portadores assintomáticos e/ou portadores sintomáticos com baixa carga parasitária, ocorrem na maioria das áreas rurais e periurbanas da Amazônia Legal. Dessa maneira, investimentos na compra do RDT analisado não atingirão o objetivo esperado para o controle da malária, principalmente quando os aspectos locais de transmissão e o adequado manuseio e interpretação por parte dos profissionais locais não são considerados.

REFERÊNCIAS

ALI, M. S.; YOUSIF, A. G.; MUSTAFA, M. S.; IBRAHIM, M. H. Evaluation of Malaria Parasite Screening Procedures Among Sudanese Blood Donors. **Clin Lab Sci**. Spring, v. 18, p. 69-73, 2005.

ÁVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. The appraisal of laboratory method addressing rolls back malaria. **Ciência e Cultura**, v.52, n.4, p. 220-228, 2000.

ÁVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. **Diagnóstico laboratorial: Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes, correlação clínico-laboratorial**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BAKER, J.; MCCARTHY, J.; GATTON, M.; KYLE, D. E.; BELIZARIO, V.; LUCHAVEZ, J.; BELL, D.; CHENG, Q. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. **J Infect Dis**. v.192,p. 870–877, 2005.

BARATA, R. C. B. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na Última Década. **Cadernos de Saúde Pública**, v 11, p. 128-136, 1995.

BAYISA, S.; KEBEDE, T.; BUGSSA, G.; ALEMU, M. Performance of SD Bioline FK80 test kit in diagnosis of malaria at Adama Malaria Center, southeast Oromia, Ethiopia. **Science Journal of Public Health**. v. 3 (1), p. 31-36, 2015.

BELIZÁRIO, V. Y.; PASAY, C. J.; BERSABE, M. J.; LEON, W. U.; GUERRERO, D. M.; BUGAOISAN, V. M. Field Evaluation of Malaria Rapid Diagnostic Tests for the Diagnosis of *P. falciparum* and non-*P. falciparum* Infections. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. v.36, p. 552-561, 2005.

BELL, D.; PEELING, R. W. WHO - Regional Office for the western Pacific/ RDT: Evaluation of rapid diagnostics tests: Malaria. **Nat Ver Microbiol**. v.4: S34- S40, 2006.

BLACK, J.; HOMMEL, M.; SNOUNOU, G.; PINDER, M. Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* and fever in malaria. **Lancet**. p. 343- 1095, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Colaboração de Agostinho Cruz Marques [et al]. Brasília. Fundação Nacional de Saúde, p.104. II, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM): Período julho de 2000 a dezembro de 2002**. Brasília: Editora MS; p. 61-62, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Malária**. Brasília: Editora MS; p. 16-21, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. SIVEP_MALÁRIA/MS. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Notificação de Casos**. 2008. Disponível em: [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp]. Acesso em mai 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária** / Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde (2012). **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica SIVEP Malária**. Disponível em: [http://www.saude.gov.br/sivep_malaria]. Acesso em 01 de jun de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde (2013). **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica SIVEP Malária**. Disponível em [http://www.saude.gov.br/sivep_malaria]. Acesso em 01 de abr de 2014.

BRUCE-CHWATT, L. J. **Essential Malariology**, 2 ed, Willian Heisemann Medical Books, London, 1985.

CAMARGO, E. P. A Malária Encenada no Grande Teatro Social. **Estud av.** v. 9, p. 211-228, 1995.

CHIODINI, P. L.; BOWERS, K.; JORGENSEN, P.; BARNWELL, J. W.; GRADY, K. K.; LUCHAVEZ, J.; MOODY, A. H.; CENIZAL, A.; BELL, D. The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.101, p. 331- 337, 2007.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

COSTA, M. R. F.; VIEIRA, P. P. R.; FERREIRA, C. O.; DE LACERDA, M. V. G.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. **Rev Soc Bras Med Trop.** 41(4). p. 381-385, 2008.

CNOPS, L.; BODERIE, M.; GILLET, P.; ESBROECK, M. V.; JACOBS, J. Rapid diagnostic tests as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. **Malar J.** p.10:67, 2011.

DEANE, L. M. Os grandes marcos na historia do controle da malária. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.25, p.12-22,1992.

DE CASTRO, M. C.; SINGER, B. H. Meio Ambiente e Saúde: Metodologia para Análise Espacial da Ocorrência de Malária em Projetos de Assentamento. **Rev Bras Est Pop. São Paulo**, v. 24, n. 2, p. 247-262, 2007.

DESOWITZ, R. S. **The malaria capers: more tales of parasites and people, research and reality**. New York: W.W. Norton, 1991.

DI SANTI, S. M.; KIRCHGATTER, K.; BRUNIALT, K. C. S.; OLIVEIRA, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; BOULOS, M. PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. v. 46, p. 183-187, 2004.

DOWLING, M. A. C.; SHUTE, G. T. A Comparative Study of Thick and Thin Blood Films in the Diagnosis of Scanty Malaria Parasitaemia. **Bull of the World health Organ**.v 34, p. 249-267, 1966.

DURRHEIM, D. N.; BECKER, P. J.; BILLINGHURST, K; BRINK, A. Diagnostic disagreement - the lessons learnt from malaria diagnosis in Mpumalanga. **S Afr Med J**. v. 87, p. 609-611, 1997.

ELAHI, R.; MOHON, A. N.; KHAN, W. A.; HAQUE, R.; ALAM, M. S. Performance of a HRP-2/pLDH based rapid diagnostics test at the Bangladesh- India-Myanmar border areas for diagnosis of clinical malaria. **Malar J**. p. 12: 378, 2013.

Evengård B, Linder E, Lundbergh P. Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. **Ann Trop Med Parasitol**. v 82(3):295-303, 1988.

FARNERT, A.; AREZ, A. P.; CORREIA, A. T.; BJORKMAN, A.; SNOUNOU, G.; DO ROSARIO, V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 93, p. 50-53, 1999.

FAYE, B. N. C.; MILLI, T. R. C.; NDIAYE, J. L.; SYLLA, K.; CAMARGO, F. W.; MARTEL, N.; FOLY, K.; LÔ, A. C.; ABIOLA, A.; SOW, D.; NDIAYE, M.; NDIAYE, D.; NDAO, M.; GAYE, O. Accuracy of HRP2 RDT (*Malaria Antigen P.f*®) compared to microscopy and PCR for malaria diagnosis in Senegal. **Pathog Glob Health**. v.107, p. 273- 278, 2013.

FEACHEM, R. G.; PHILLIPS, A. A.; HWANG, J.; COTTER, C.; WIELGOSZ, B.; GREENWOOD, B. M.; SABOT, O.; RODRIGUES, M. H.; ABEYASINGHE, R. R.; GHEBREYESUS, T. A.; SNOW, R. W: Shrinking the malaria map: Progress and prospects. **Lancet**.v. 376, p. 1566-1578, 2010.

FOGG, C.; TWESIGYE, R.; BATWALA, V.; PIOLA, P.; NABASUMBA, C.; KIGULI, J.; MUTEBI, F.; HOOK, C.; GUILLERM, M.; MOODY, A.; GUTHMANN, J. P. Assessment of three new parasite lactate dehydrogenase (pan-pLDH) tests for diagnosis of uncomplicated malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 102, p. 25-31, 2008.

FREITAS, F. T. M.; COSTA, C. M.; NOBREGA, A. A.; ARAUJO, W. N. Surto de Malária no Distrito de Jaci-Paraná, Município de Porto Velho-RO, em 2009. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Secretaria de Vigilância em saúde. Ministério da Saúde. Brasília. Ano 10. N. 5, 2010.

GAMBOA, D.; HO, M. F.; BENDEZU, J.; TORRES, K.; CHIODINI, P. L.; BARNWELL, J. W.; INCARDONA, S.; PERKINS, M.; BELL, D.; MCCARTHY, J.; CHENG, Q. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. **PLoS One**. 5(1):e 8091, 2010.

GOMES, T. L.; TADA, M. S.; KATSURAGAWA, T. H.; PÓVOA, M. M.; VIANA, G. M. R.; ALECRIM, M. C.; SANTANA-FILHO, F. S.; ARCANJO, A. R. L.; COUTO, A. A. R. A.; CALVOSA, V. S. P.; NERY, A. F.; FONTES, C. J. F. Low sensitivity of malaria rapid diagnostic tests stored at room temperature in the Brazilian Amazon Region. **J Infect Dev Ctries**, v.7 (3), p. 243-252, 2013.

HANSCHIED, T. Diagnosis of Malaria: A Review of Alternatives to Conventional Microscopy. **Clin Lab Haematol**. v. 21, p. 235-245, 1999.

HANSCHIED, T.; VALADAS, E.; GROBUSH, M. P. Polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria: safe and useful? **Emerg Infect Dis**.v. 8, p. 872; author reply 873-4, 2002.

HAWKES, M.; CONROY, A.; OPOKA, R. O.; NAMASOPO, S.; LILES, W. C.; JOHN, C. C.; KAIN, K. C. Use of a three-band HRP2/pLDH combination rapid diagnostic test increases diagnostic specificity for falciparum malaria in Ugandan children. **Malar J**. p. 13:43, 2014.

HOUWEN, B. Blood film preparation and staining procedures. **Clin Lab Med**. 22: 1-14, 2002.

HUMAR, A; OHRT, C; HARRINGTON, M. A.; PILLAI, D.; KAIN, K. C.; PARASIGHT, F. Test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. **Am J Trop Med Hyg**. v. 56(1), p. 44–8, 1997.

IQBAL, J.; SIDDIQUE, A.; JAMEEL, M.; HIRA, P. R. Persistent Histidine-Rich Protein 2, Parasite Lactate Dehydrogenase and Pan-malarial Antigen Reactivity after Clearance of *Plasmodium falciparum* Mono-infection. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 9, p. 4237-4241, 2004.

ISHENGOMA, D. S.; LWITIHO, S.; MADEBE, R. A.; NYAGONDE, N.; PERSSON, O.; VESTERGAARD, L. S.; BYGBJERG, I. C.; LEMNGE, M. M.; ALIFRANGIS, M. Using rapid diagnostic tests as source of malaria parasite DNA for molecular analyses in the era of declining malaria prevalence. **Malar J**, p. 10:6, 2011.

JOHNSON, N. L.; KOTZ, S. **Encyclopedia of statistical sciences**. New York: John Wiley & Sons; v.4, p.352-4, 1983.

JORGENSEN, P.; CHANTAP, L.; REBUENO, A.; TSUTUOKA, R.; BELL, D. Malaria rapid diagnostic tests in tropical climates: the need for a cool chain. **Am J Trop Med Hyg**. v. 74, p.750- 754, 2006.

KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; SILVA, L. H. P. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. **Estud av**. 22(64):111- 41, 2008.

KILLIAN, A. H. D.; METZGER, W. G.; MUTSHELKNAUSS, E. J.; KAGAMBE, G.; LANGI, P.; KORTE, R.; SONNENGURG, F. V. Reliability of Malaria Microscopy in Epidemiological Studies: Results of Quality Control. **Trop Med Int Health**. v.5, p. 3-8, 2000.

KIM, S. H.; NAM, M. H.; ROH, K. H.; PARK, H. C.; NAM, D. H.; HAM, G. T. H.; KLEIN, T. A.; LIM, C. S. Evaluation of a rapid diagnostic test specific for *Plasmodium vivax*. **Tropical Medicine and International Health**. v.13, p. 1495-1500, 2008.

KIMURA, M.; KANEDO, O.; LIU, Q.; ZHOU, M.; KAWAMOTO, F.; WATAYA, Y.; OTANI, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANABE, K. Identification of the four species of human malaria parasites by *nested* PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**. v.46, p. 91-95,1997.

KNELL, A. J. **Malaria**. Oxford, Oxford Univ. Press, 1991.

KOITA, O. A.; DOUMBO, O. K.; OUATTARA, A.; TALL, L. K.; KONARE, A.; DIAKITE, M.; DIALLO, M.; SAGARA, I.; MASINDE, G. L.; DOUMBO, S. M.; DOLO, A.; TOUNKARA, A.; TRAORÉ, I.; KROGSTAD, D. J. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. **Am J Trop Med Hyg**. v. 86(2), p.194–8, 2012.

KOLACZINSKI, J.; MOHAMMED, N.; ALI, I.; ALI, M.; KHAN, N.; EZARD, N.; ROWLAND, M. Comparison of the Optimal rapid antigen test with field microscopy for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: considerations for the application of the rapid test in Afghanistan. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 98, p.15-20, 2004.

KOSACK, C. S.; NAING, W. T.; PIRIOU, E.; SHANKS, L. Routine parallel diagnosis of malaria using microscopy and the malaria rapid diagnostic test SD 05FK60: The experience of medeciuns sans frontieres in Myanmar. **Malar J**. v. 12, p. 167, 2013.

LEE, N.; BAKER, J.; ANDREWS, K. T.; GATTON, M. L.; BELL, D.; CHENG, Q.; MCCARTHY, J. S. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. **J Clin Microbiol**. v. 44, p, 2773–2778, 2006.

LEE, N.; GATTON, M. L.; PELECANOS, A.; BUBB, M.; GONZALEZ, I.; BELL, D.; CHENG, Q.; MCCARTHY, J. S. Identification of optimal epitopes for *Plasmodium falciparum* rapid diagnostic tests that target histidine-rich proteins 2 and 3. **J Clin Microbiol.** v. 50, p. 1397–1405, 2012.

LIMA, Gisele Fernandes Maciel de Castro. **Análise comparativa da PCR em tempo real, Nested PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em pool, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de Malária em larga escala.** (Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

LONDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics.** v. 33, p. 159-174, 1977.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Rev Panam Salud Públ.** v.11, p. 235-43, 2002.

LORENZETTI, A.; FORNAZARI, P. A.; BONINI-DOMINGOS, A. C.; SOUZA, R. P. R.; FUGIKAH, E.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; FRAGA, V. D.; CONCEIÇÃO, L. M.; ROSSIT, A. R.; CAVASINI, C. E.; COUTO, V. S.; MACHADO, R. L. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. **Acta Tropica.** v. 107, p. 8-12, 2008.

LUZ, F. C.; FERNADEZ-RAMIREZ, C. T. **Diagnóstico Laboratorial de Malária,** Curso número 2, módulos A2, B2, C2, D1, D2, E1, E2, 3a Reunião Nacional dos Pesquisadores em Malária, UnB, Brasília, 1990.

MARX, A.; PEWSNER, M. D. D.; EGGER, M.; NÜESCH, R.; BUCHER, H. C.; GENTON, B.; HATZ, C.; JÜNI, P. Meta-analysis: Accuracy of rapid tests for malaria in travelers returning from endemic areas. **Ann Intern Med.** v.142. p. 836-846, 2005.

MAGUIRE, J. D.; LEDERMAN, E. R., BARCUS, M. J.; O'MEARA, W. A.; JORDON, R. G.; DUONG, S.; MUTH, S.; SISMADI, P.; BANGS, M. J.; PRESCOTT, W. R.; BAIRD, J. K.; WONGSRICHANALAI, C. Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and quality assurance during an are of declining diagnostics proficiency. **Malar J.** v. 5, p. 92, 2006.

MANSO, Mônica Regina Farias Costa. **Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase no Diagnóstico de Malaria.** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) Universidade Estadual do Amazonas; FMTAM, Manaus, 2004.

MAKLER, M. T.; PALMER, C. J.; AGER, A. L. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 92, p. 419-433, 1998.

MARQUES, A. C.; GUTIERREZ, H. C. Combate a Malária no Brasil: Evolução, Situação atual e Perspectivas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, supl. III, p. 91-108, 1994.

MASON, D. P.; KAWAMOTO, F.; LIN, K.; LAOBOONCHAI, A.; WONGSRICHANALAI, C. A comparison of two rapid field immunochromatographic test to expert microscopy in the diagnosis of malaria. **Acta Tropica**. v. 82, p. 51-59, 2002.

MCKENZIE, F. E.; SIRICHAISINTHOP, J.; MILLER, R. S.; GASSER, R. A. Jr; WONGSRICHANALAI, C. Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. **Am J Trop Med Hyg**. v. 69, p. 372-376, 2003.

MENDOZA, N. M.; CUCUNUBÁ, Z. M.; APONTE, S.; GONZÁLEZ, N. E.; BERNAL, S. D. Field evaluation for diagnostic accuracy of the rapid test SD Bioline Malaria Antigen Pf/Pv® in Colombia. **Biomédica**. v. 33, 2013.

MOODY, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. **Clin Microbiol Rev**. v.15, p. 66-78, 2002.

MOHON, A. N.; ELAHI, R.; PODDER, M. P.; MOHIUDDIN, K.; HOSSAIN, M. S.; KHAN, W. A.; HAQUE, R.; ALAM, M. S. Evaluation of the onsite (Pf/Pan) rapid diagnostic test for diagnosis of clinical malaria. **Malar J**. v. 11, p. 415, 2012.

MOONEN, B.; COHEN, J. M.; SNOW, R. W.; SLUTSKER, L.; DRAKELEY, C.; SMITH, D. L.; ABEYASINGHE, R. R.; RODRIGUEZ, M. H.; MAHARAJ, R.; TANNER, M.; TARGETT, G. Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination. **Lancet**. v. 376, p. 1592-1603, 2010.

MURRAY, C. K.; BELL, D.; GASSER, R. A.; WONGSRICHANALAI, C. Rapid Diagnostic Testing for Malaria. **Trop Med intern Health**. v. 8, p. 876-883, 2003.

MURRAY, C. K.; GASSER, R. A.; MAGILL, A. J.; MILLER, R. S. Update on rapid diagnostic testing for malaria. **Clin Microbiol Rev**. v.21, p. 97-110, 2008.

MURRAY, C. K.; BENNETT, J. W. Rapid diagnosis of malaria. **Interdiscip perspect infect Dis**, 2009.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo, Atheneu, 11^a ed. 2005.

ODUOLA, A. M.; OMITOWOJU, G. O.; SOWUNMI, A.; MAKLER, M. T.; FALADE, C. O.; KYLE, D. E.; FEHINTOLA, F. A.; OGUNDAHUNSI, O. A.; PIPER, R. C.; SCHUSTER, B. G.; MILHOUS, W. K. *Plasmodium falciparum*: evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic responses to standard antimalarial drugs in Nigeria. **Exp Parasitol**. v.87, p. 283-289, 1997.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J.** v. 9, p.115, 2010.

PALMER, C. J.; LINDO, J. F.; KLASKALA, W. I.; QUESADA, J. A.; KAMINSKY, R.; BAUM, M. K.; AGER, A. L. Evaluation of the OptiMal-IT® Test for Rapid Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 203-206, 1998.

PARRA, M. E.; EVANS, C. B.; TAYLOR, D. W. Identification of *Plasmodium falciparum* histidine-Rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. **J Clin Microbiol.** v.29, p.1629-1634, 1991.

PENHALBEL, R. S. R.; FUGIKAH, E.; LORENZETTI, A.; ALVES, R. T.; CAVASINI, C. E.; ROSSIT, A. R. B.; CALVOSA, V. S. P.; COUTO, A. A. D.; MACHADO, R. L. D. Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.38(2), p.194-195, 2005.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 10^a ed, 1978.

PIPER, R.; LEBRAS, J.; WENTWORTH, L.; HUNT-COOKE, A.; HOUZE, S.; CHIODINI, P.; MAKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **Am J Trop Med Hyg.** v. 60. p, 109-118, 1999.

REY, L. Parasitologia: **Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RODULFO, H.; DE DONATO, M.; MORA, R.; GONZALEZ, L.; CONTRERAS, C. E. Comparison of the diagnosis of Malaria by microscopia, immunochromatography and PCR in endemic áreas of Venezuela **Braz J Med Biol Res.** v.40, p. 535-543, 2007.

SEED, C. R.; KITCHEN, A.; DAVIS, T. M. The Current Status and Potencial Role of Laboratory Testing to Prevent Transfusion-Transmitted Malaria. **Transfus Med Rev.** v. 19, p. 229-40, 2005.

SINGH, B.; COX-SINGH, J.; MILLER, A. O.; ABDULLAH, M.S; SNOUNOU, G; RAHMAN, H. A. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 90, p. 519-521, 1996.

SINGH, B.; KIM SUNG, L.; MATUSOP, A. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Clin Infect Dis.** 363(9414), p. 1017-1024, 2004.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. **Avaliação da Estratégia Global de Controle Integrado da Malária no Brasil**. Brasília: OPAS. p. 9-15, 2001.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Mol Biochem Parasitol**. v. 58, p. 283-292, 1993(a).

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; ZHU, X. P.; JARRA, W.; PINHEIRO, L.; DO ROSARIO, V. E.; THAITHONG, S.; BROWN, N. K. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol**. v. 61(2), p. 315–320, 1993(b).

SNOUNOU, G. Detection and Identification of the Four Malaria Parasite Species Infecting Humans by PCR Amplification. **Methods Mol Biol**. v.2, p. 2415-2427, 1996.

STANDARD DIAGNOSTICS, INC. 2010. Disponível em: [\[http://kimhung.vn/uploads/download/files/reagents-kits/sd/brochure_35.pdf\]](http://kimhung.vn/uploads/download/files/reagents-kits/sd/brochure_35.pdf). Acesso em mai 2014.

STANDARD DIAGNOSTICS, INC. **A high performing rapid test for the differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and other *Plasmodium* species (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*)**. 2013. Disponível em: [\[http://www.Alere.com/content/dam/alere/images/InfectiousDiseases/Brochure.pdf\]](http://www.Alere.com/content/dam/alere/images/InfectiousDiseases/Brochure.pdf). Acesso em mai 2014.

STANDARD DIAGNOSTICS, INC. Disponível em: http://kimhung.vn/uploads/download/files/reagents-kits/sd/brochure_35.pdf. Acesso em 20 de Agosto de 2014.

STOW, N. W.; TORRENS, J. K.; WALKER, J. Na assessment of the accuracy of clinical diagnosis, local microscopy and a rapid immunochromatographic card test in comparison with expert microscopy in the diagnosis of malaria in rural Kenya. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 93, p. 519-520, 1999.

TAUIL, P. L. **Avaliação de uma nova estratégia de controle da malária na Amazônia Brasileira**. [tese de doutorado]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2002.

TROUVAY, M.; PALAZON, G.; BERGER, F.; VOLNEY, B.; BLANCHET, D.; FAWAY, E.; DONATO, D.; LEGRAND, E.; CARME, B.; MUSSET, L. High performance of histidine-rich protein 2 based rapid diagnostic tests in French Guiana are explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. **Plos One**. v.8, s/p, 2013.

VERON, V.; CARME, B. Recovery and use of plasmodium DNA from malaria rapid diagnostic tests. **Am J Trop Med Hyg**. v. 74(6), p.941–943, 2006.

WONGSRICHANALAI, C.; BARCUSMJ, M. U. T. H. S.; SUTAMIHARDJA, A.; WERNSDORFER, W. H. A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). **Am J Trop Med Hyg.** v.77, p. 119-127, 2007.

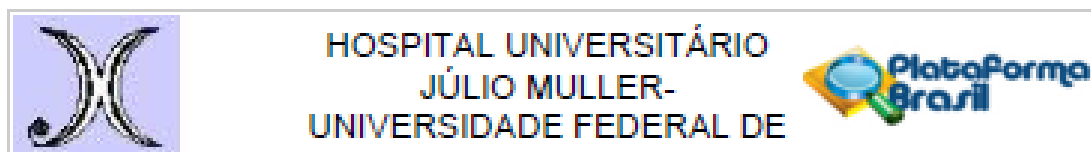
WHO. World Health Organization. **News Perspectives - Malaria Diagnosis.** Geneva, out. 1999.

WHO. World Health Organization. **Malaria diagnostics, New Perspectives.** WHO/MAL, 1091, p. 4-29, 2000.

WHO. World Health Organization. **World malaria report**, ISBN 978 92 4 156469 4, 2013.

WHO. World Health Organization. **World health statistics**, ISBN 978 92 4 156471 7, 2014.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para a malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho.

Pesquisador: Luciano Teixeira Gomes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07738212.4.0000.5541

Instituição Proponente: Hospital Universitário Júlio Muller-MT

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 146.387

Data da Relatoria: 14/11/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma proposta de estudo transversal a ser realizado com a demanda espontânea de um ambulatório de referência que atende pacientes com suspeita de malária em Porto Velho-Rondônia e que se propõe a testar um método de diagnóstico rápido de malária-TDR.

O estudo é colaborativo entre a Universidade Federal de Mato Grosso e o Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM -Rondônia. O projeto está claro e bem estruturado não deixando dúvidas à sua compreensão.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avallar e descrever os resultados do desempenho do TDR SD Bioline Malaria Antigen P.f/Pan POCT (Standard Diagnostics, Korea) que detecta a proteína 2 rica em histidina (HRP2) do *P. falciparum* e a proteína Lactato Desidrogenase (panLDH), em um centro de referência de diagnóstico e tratamento para malária na cidade de Porto Velho (RO).

Objetivo Secundário:

- Avallar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e razão de verossimilhança positiva e negativa do TDR, tendo a gota espessa e a PCR em tempo real para diagnóstico da malária como padrão ouro para o diagnóstico da doença. - Avallar os parâmetros de validade do TDR em diferentes níveis de parasitemia. - Avallar os parâmetros de validade do TDR de acordo com o

antígeno plasmodial pesquisado, ou seja, de acordo com a espécie encontrada. - Comparar os

Endereço: Rua Fernando Correa da Costa nº 2367

Bairro: Boa Esperança

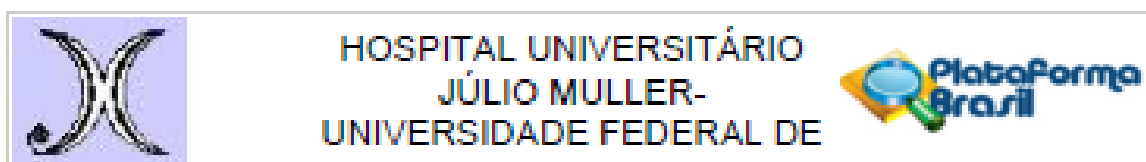
CEP: 78.060-900

UF: MT

Município: CUIABÁ

Telefone: (83)3815-8254

E-mail: shirleyfp@bol.com.br



resultados do presente estudo com aqueles encontrados na literatura, de acordo com o antígeno pesquisado e a espécie encontrada

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos para o participante e que consistirá no fornecimento de pequena quantidade de sangue adicional para realização dos métodos diagnósticos a serem avaliados.

Benefícios: a aplicação deste teste não mudará o tratamento nem o diagnóstico do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de método diagnóstico de aplicabilidade bem definida, de interesse para o serviço de saúde ao acrescentar novo método diagnóstico a uma endemia prevalente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: adequada

TCLE: adequado, mas deve ainda substituir alguns termos que os pacientes possam não entender.

Inclusão e compromisso da Instituição onde será realizada a pesquisa.

O orçamento refere gastos apenas com passagens. Não deixa claro demais gastos de custeio que possam estar envolvidos - reagentes, kits diagnósticos, etc.

Recomendações:

Rever se as despesas descritas poderão ser supridas com recursos próprios, embora tenham apresentado o compromisso da Instituição de realizar os exames.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores esclareceram todas as pendências. Propomos a aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado em relação à análise ética.

Endereço: Rua Fernando Correa da Costa nº 2387

Bairro: Boa Esperança

CEP: 78.060-900

UF: MT

Município: CUIABÁ

Telefone: (63)3615-8254

E-mail: shirleyfp@bol.com.br



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
JÚLIO MULLER-
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



CUIABA, 14 de Novembro de 2012

Assinador por:
SHIRLEY FERREIRA PEREIRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Fernando Correa da Costa nº 2387

Bairro: Boa Esperança

UF: MT

Telefone: (83)3815-8254

Município: CUIABA

CEP: 78.060-900

E-mail: shirleyfp@bol.com.br



**GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL DE RONDÔNIA**


A/C
LUCIANO TEIXEIRA GOMES
Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT

Porto Velho, 08 de outubro de 2012.

Prezado senhor,

O Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), irá colaborar com V.Sa. em seu estudo intitulado “*Avaliação do desempenho de um teste de diagnóstico rápido para malária em unidade de atendimento à doença na cidade de Porto Velho*”, prestando assistência com nossa equipe para coleta de sangue de pacientes que buscam atendimento de diagnóstico da malária em nosso laboratório, bem como a execução dos procedimentos do teste de diagnóstico rápido, conforme seu protocolo de pesquisa.

Atenciosamente,


Dr. Mauro Shugiro Tada
Diretor Geral do CEPEM

Dr. Mauro Shugiro Tada
Diretor Geral
CEPEM/SESAU/CFM/665

FICHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DO TDR SD BIOLINE	
¹ Número: SD _____	Nome: _____
O paciente apresenta sintomas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Quantos dias de sintomas? _____ dias
O paciente está em uso de medicamentos? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Quais medicamentos? _____	
² Foi coletado papel filtro do paciente? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
³ Foi coletado 2ª gota espessa para revisão? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
⁴ Resultado 1ª gota espessa: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	Parasitemia: p/μL
Resultado 2ª gota espessa: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	Parasitemia: p/μL
Resultado da PCR: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	
1) A numeração deverá ser sequencial e contendo as iniciais SD, visando melhor caracterização das amostras desse projeto. 2) Deverá ser colhido sangue total em papel filtro para realização da PCR. 3) Para todos os pacientes com suspeita de malária deverão ser confeccionadas duas lâminas de gota espessa. Uma das lâminas de gota espessa, deverá ser enviada para posterior conferência pelos membros da pesquisa de Cuiabá. 4) O Resultado da parasitemia deverá ser dado em parasitos/μL, contando-se todos os parasitos encontrados em 200 campos microscópicos e multiplicado-se o resultado por 2,5.	

FICHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DO TDR SD BIOLINE	
¹ Número: SD _____	Nome: _____
O paciente apresenta sintomas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Quantos dias de sintomas? _____ dias
O paciente está em uso de medicamentos? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Quais medicamentos? _____	
² Foi coletado papel filtro do paciente? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
³ Foi coletado 2ª gota espessa para revisão? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
⁴ Resultado 1ª gota espessa: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	Parasitemia: p/μL
Resultado 2ª gota espessa: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	Parasitemia: p/μL
Resultado da PCR: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	
1) A numeração deverá ser sequencial e contendo as iniciais SD, visando melhor caracterização das amostras desse projeto. 2) Deverá ser colhido sangue total em papel filtro para realização da PCR. 3) Para todos os pacientes com suspeita de malária deverão ser confeccionadas duas lâminas de gota espessa. Uma das lâminas de gota espessa, deverá ser enviada para posterior conferência pelos membros da pesquisa de Cuiabá. 4) O Resultado da parasitemia deverá ser dado em parasitos/μL, contando-se todos os parasitos encontrados em 200 campos microscópicos e multiplicado-se o resultado por 2,5.	

FICHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DO TDR SD BIOLINE	
¹ Número: SD _____	Nome: _____
O paciente apresenta sintomas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Quantos dias de sintomas? _____ dias
O paciente está em uso de medicamentos? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Quais medicamentos? _____	
² Foi coletado papel filtro do paciente? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
³ Foi coletado 2ª gota espessa para revisão? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
⁴ Resultado 1ª gota espessa: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	Parasitemia: p/μL
Resultado 2ª gota espessa: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	Parasitemia: p/μL
Resultado da PCR: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Mista	
1) A numeração deverá ser sequencial e contendo as iniciais SD, visando melhor caracterização das amostras desse projeto. 2) Deverá ser colhido sangue total em papel filtro para realização da PCR. 3) Para todos os pacientes com suspeita de malária deverão ser confeccionadas duas lâminas de gota espessa. Uma das lâminas de gota espessa, deverá ser enviada para posterior conferência pelos membros da pesquisa de Cuiabá. 4) O Resultado da parasitemia deverá ser dado em parasitos/μL, contando-se todos os parasitos encontrados em 200 campos microscópicos e multiplicado-se o resultado por 2,5.	